

Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias
Departamento de Biología Molecular y Bioquímica



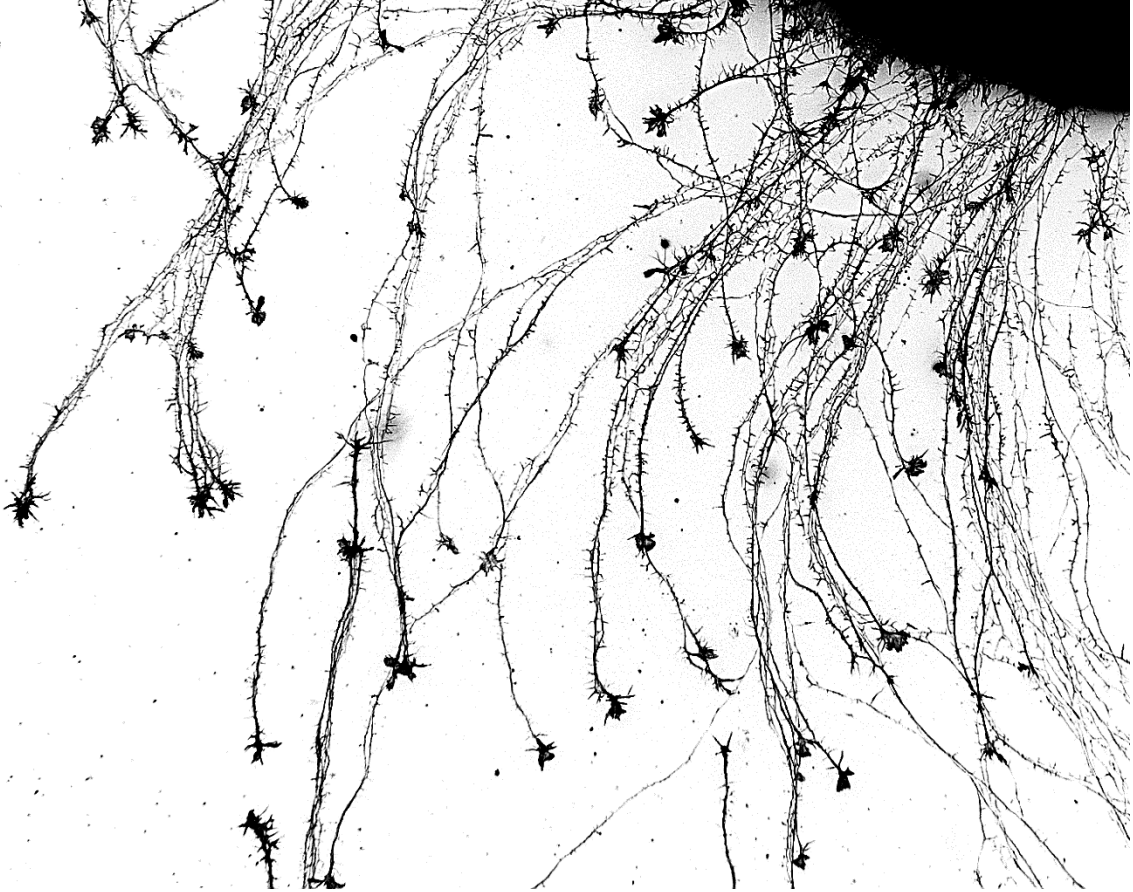
Papel de Boc y Sfrp1/2 en la especificación y guía de los axones de las Células Ganglionares de la Retina.

Trabajo de Investigación que presenta
Francisco Javier Nieto López
Para optar al grado de Doctor en Ciencias
Por la Universidad Autónoma de Madrid.
Mayo, 2015

Dirigido por la Doctora
Paola Bovolenta
Profesor de Investigación del CSIC
Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa"

La realización de esta tesis doctoral ha sido posible gracias a la concesión de una Ayuda Predoctoral de Formación del Profesorado Universitario (FPU) del Ministerio de Educación (AP2009-0349). Su desarrollo ha tenido lugar en el laboratorio de la Dra. Paola Bovolenta Nicolao, en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, centro mixto del Consejo de Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Esta tesis ha sido dirigida por la Dra. Paola Bovolenta Nicolao.

Índice

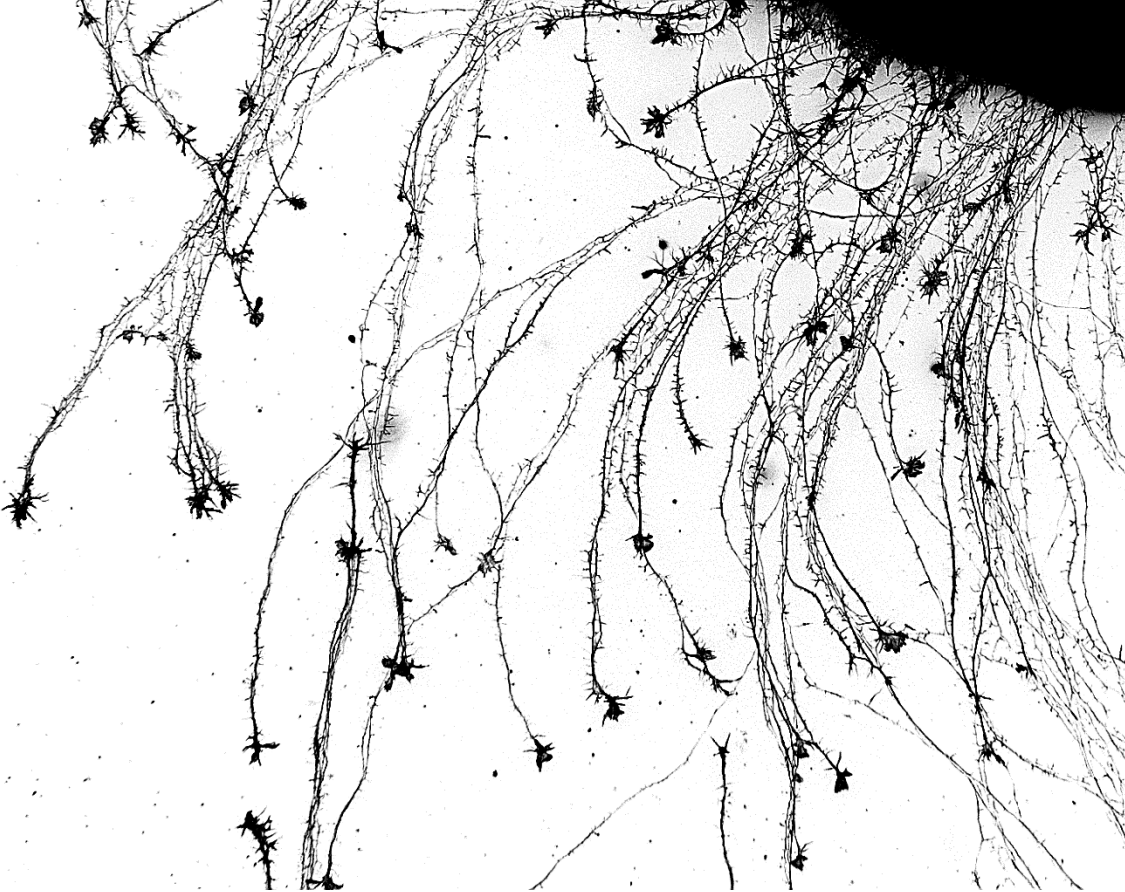


Abstract	7
Resumen	11
Abreviaturas	15
Introducción	21
1.1 El sistema visual	24
1.2 Especificación de las CGR	28
1.3 Señalización de Hedgehog	29
1.4 Brother Of Cdon (Boc)	33
1.5 Guía axonal	36
1.6 Guía axonal de las CGR	37
1.7 Señalización de Wnt	39
1.8 Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRPs)	41
Objetivos	45
2.1 Capítulo I: Papel de Boc en la especificación de las CGR en la región VT de la retina	47
2.2 Capítulo II: Papel de Sfrp1/2 en la guía de los axones de las CGR	48
Materiales y Métodos	51
3.1 Animales de experimentación	53
3.2 Plásmidos	53
3.3 Hibridación in situ	54
3.4 Inmunofluorescencia / inmunohistoquímica	54
3.5 Reacción de la β -galactosidasa	55
3.6 Trazados anterógrados/retrógrados	55
3.7 Electroporación <i>in utero</i> / <i>ex utero</i>	57
3.8 Cultivo de explantes	57
3.9 qRT-PCR	58
3.10 Western Blots	58
3.11 Análisis de imagen y estadístico	59
Resultados	63
4.1.1 La proyección ipsilateral está reducida en ausencia de Boc	67
4.1.2 Boc actúa por debajo de Zic2 pero no es suficiente para activar el programa ipsilateral	68
4.1.3 Boc es necesario para mantener el correcto número de CGR zic2 positivas en la región VT de la retina	71

Índice

4.1.4 Boc es necesario para mantener el correcto número de células Islet2/Shh positivas dentro de la región VT de la retina.	73
4.1.5 La organización de las proyecciones de la retina al NGLd está alterada en la ausencia de <i>Boc</i>	75
4.1.6 Existe un bucle regulatorio entre la expresión de <i>Zic2</i> y la señalización de Shh en la región VT de la retina.....	79
4.2.1 Sfrp1 y Sfrp2 se expresan en ojo y se distribuyen a lo largo de la vía visual en ratón	85
4.2.2 Sfrp1 y Sfrp2 son necesarios para la correcta guía de los axones de las CGR en la retina.	86
4.2.3 Los Sfrps son necesarios para el correcto crecimiento de los axones de las CGR a nivel de quiasma y tracto óptico.	90
4.2.4 Los Sfrps influyen en la fasciculación de los axones de las CGR durante su crecimiento mediante un mecanismo dependiente de ADAM10.	93
Discusión	101
Conclusiones	117
Bibliografía	121
Apéndice	139

Abstract

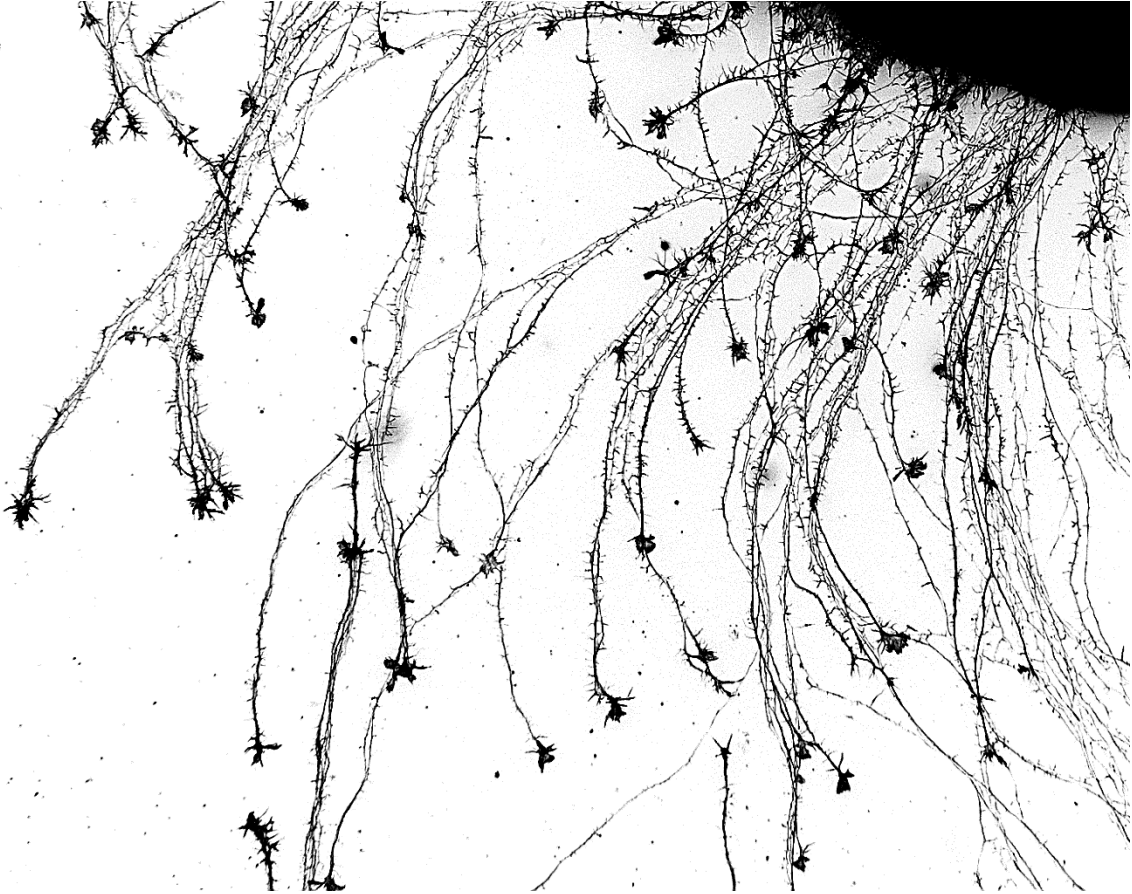


Retinal neurogenesis starts with RGC differentiation, RGC can be categorized in different types according to their morphology, physiology, molecular characteristics or projection laterality. Conforming to the latter characteristic mouse RGCs can be divided into: contralateral projecting RGCs (cRGC), which express *Islet2* and *Shh* both important for their differentiation process; and ipsilateral projecting RGCs (iRGCs), which express *Zic2* and the Shh receptor, *Boc*. As they differentiate, RGCs extend an axon that grows along the visual pathway, guided by axon guidance molecules, including, for example, *Sfrp1*. Indeed, *Sfrp1* has been implicated in the reorientation of RGC growth cones in both *Xenopus* and chick.

In this thesis, we asked if *Boc* plays a role in the specification of mouse iRGCs and if this activity is related with Shh signalling. We also analysed whether and how *Sfrp1/2* contribute to the correct growth and guidance of mouse RGCs. Analysis of *Boc* mutants showed a reduction of *Zic2*-positive iRGCs cells and an increase in *Islet2/Shh*-positive cRGCs into the VT region. This shift in the proportion of RGC types alters the projection pattern to the dLGN. This change in RGC specification results from the alteration of a feedback regulatory loop between *Zic2* and Shh signalling, as demonstrated by *in utero* electroporation experiments. Overexpression of *Shh* in the VT region reduced *Zic2* expression; on the contrary, ectopic *Zic2* expression into the central retina decreased Shh levels. On the other hand, genetic inactivation of *Sfrp1/2* causes intraretinal axon guidance defects and defasciculation of the RGC axons as they grow along the visual pathway. The defasciculation defects are likely a consequence of an increase in ADAM10 activity, which is negatively regulated by *Sfrps*. Indeed, retinal explants from *Sfrp1/2* null mice grow neuritis with a dishevelled appearance; this defect is reversed by the addition of a specific ADAM10 inhibitor. These observations are associated with an increase in L1 and N-cadherin processing in the visual pathway of *Sfrp1/2* mutants and in explants overexpressing ADAM10.

Based on these results, we propose that *Boc* negatively modulates Shh signalling in VT region of the retina, allowing *Zic2* expression. This regulation in turns controls the generation of the correct number of iRGC. Our results also indicate that *Sfrp1/2* are implicated in RGC axon guidance by a direct and indirect mechanisms.

Resumen

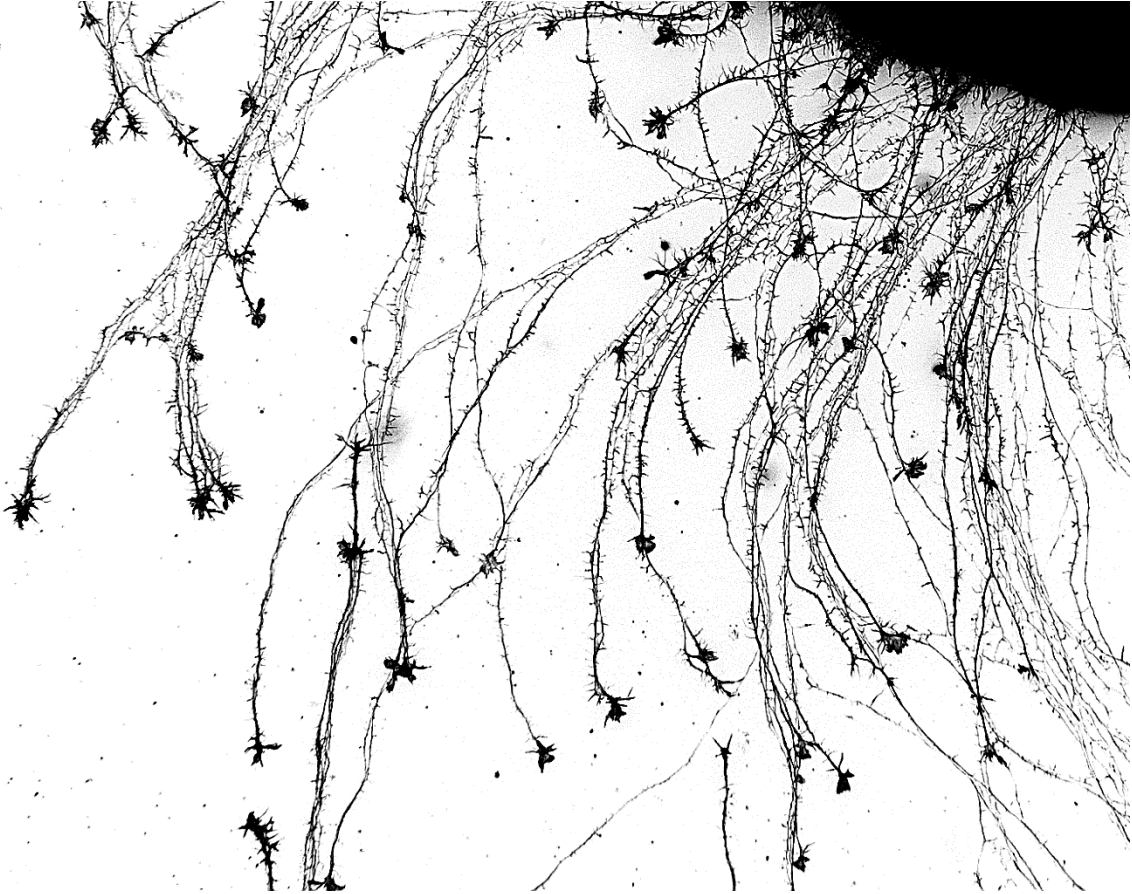


La neurogénesis en la retina comienza con la diferenciación de las CGR. Las CGR pueden clasificarse en diferentes tipos dependiendo de su morfología, fisiología, características moleculares o lateralidad de sus proyecciones. Respecto a esta última característica, las CGR de ratón se dividen en: CGR que proyectan contralateralmente (CGRc), las cuales expresan *Shh* e *Islet2* ambos importantes en su proceso de diferenciación; y las CGR que proyectan ipsilateralmente (CGRi), las cuales expresan *Zic2* y el receptor de Shh, *Boc*. Cuando las CGR se han diferenciado extienden un axón que crece a lo largo de la vía visual, este axón es guiado por moléculas de guía axonal, las cuales incluyen a Sfrp1. Sfrp1 ha sido implicado en la reorientación de los conos de crecimiento de las CGR en *Xenopus* y pollo.

En esta tesis, nos hemos preguntado si Boc juega un papel en la especificación de las CGRi en ratón, y si su actividad está relacionada con la señalización de Shh. También hemos analizado si Sfrp1/2 contribuyen al correcto crecimiento y guía de los axones de las CGR en ratón, y en caso de ser así, cual es el mecanismo. El análisis de los mutantes de Boc muestran una reducción de las CGRi *Zic2* positivas y un incremento de las CGRc *Islet2/Shh* positivas dentro de la región VT. Este cambio en la proporción de los tipos de CGR tiene como consecuencia una alteración en el patrón de proyección al NGLd. Este cambio en la especificación de las CGR es el resultado de la alteración del bucle regulatorio existente entre *Zic2* y la señalización de Shh, como demostramos mediante la electroporación *in utero*. La sobreexpresión de *Shh* en la región VT reduce la expresión de *Zic2*; por el contrario, la expresión ectópica de *Zic2* dentro de la retina central produce una bajada en los niveles de expresión de *Shh*. Por otro lado, la inactivación genética de *Sfrp1/2* causa defectos en la guía de los axones dentro de la retina y desfasciculación de los axones de las CGR cuando crecen a lo largo de la vía visual. Los defectos de desfasciculación se podrían deber a un incremento en la actividad de ADAM10, la cual es negativamente regulada por Sfrps. En efecto, los explantes de retina provenientes de ratones nulos para *Sfrp1/2* presentan un crecimiento desfasciculado de las neuritas; este defecto fue revertido mediante la adición de un inhibidor específico de ADAM10. Estas observaciones son asociadas con un incremento en el procesamiento de las moléculas de adhesión L1 y N-caderina, tanto en la vía visual de los mutantes de *Sfrp1/2* como en explantes que sobreexpresan ADAM10.

En base a estos resultados proponemos que Boc modula negativamente la señalización de Shh en la región VT de la retina, permitiendo así que se exprese *Zic2*, y por lo tanto se genere un número correcto de CGRi. Nuestros datos también indican que *Sfrp1/2* están involucrados en la guía de los axones mediante mecanismos directos e indirectos.

Abreviaturas



Abreviaturas

ADAM	A Disintegrin And Metalloproteinase
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
AMP	Adenosín Monofosfato
APC1	Adenomatous Polyposis Coli
APP	Amyeloid Precursor Protein
ARN	Ácido Ribonucleico
ARNm	Ácido Ribonucleico mensajero
Ath5	Atonal Homolog 5
BMP	Bone Morphogenetic Protein
Boc	Brother of Cdon
Boi	Brother of Ihog
Ca ²⁺	Ión Calcio
Calc	Calcineurina
CAMKIII	Calmodulina Kinasa III
CAMs	Cell adhesion molecules
Cdon	Cell adhesion molecule-related/down regulated by oncogenes
CGR	Célula Ganglionar de la Retina
CGRc	Célula Ganglionar de la Retina contralateral
CGRi	Célula Ganglionar de la Retina ipsilateral
Ci	Cubitus interruptus
CiA/R	Cubitus interruptus Activador/Represor
CKI	Casein Kinase I
CRD	Cysteine Rich Domain
CS	Colículo Superior
CXCR4	C-X-C chemokine Receptor 4
Dcc	Deleted in Colorectal Carcinoma
Dhh	Desert Hedgehog
Dil	Diocadecyl-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina
DiO	3,3'-diocadeciloxacarbocianina
Dll	Dallylike
DO	Disco Óptico
EP	Epitelio Pigmentario
EphB1	Ephrin receptor B1
Evi	Evenness interrupted
FGF	Fibroblast Growth Factor
FnIII	Fibronectina tipo III
FoxD1	Forkhead box D1
Fz	Frizzled
Gas1	Growth arrest-specific 1
GFP	Green Fluorescence Protein
Gli1/2/3	Glioma-associated oncogen1/2/3
GliA/R	Glioma-associated oncogen Activador/Represor
GMP	Guanina Mono Fosfato
GSK3-b	Glycogen synthase kinase 3-b
Hh	Hedgehog
Hhip	Hedgehog-interacting protein

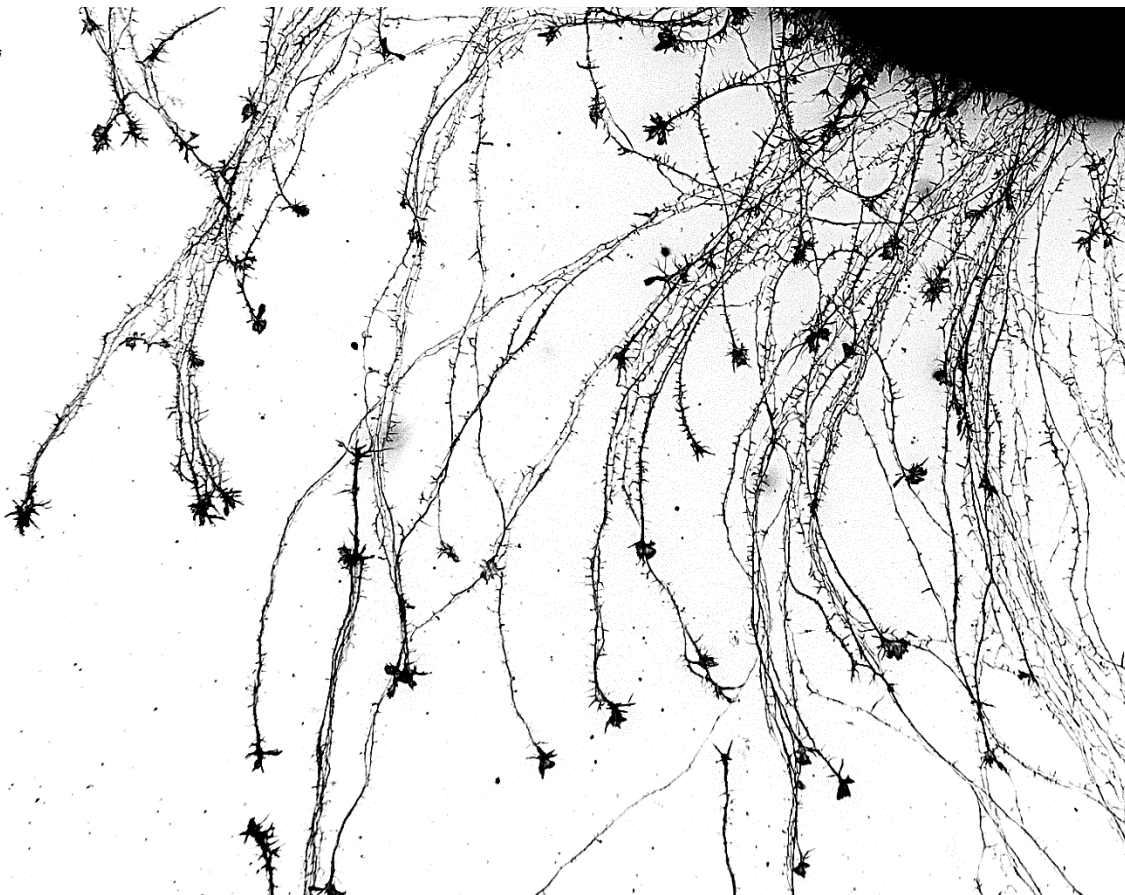
Abreviaturas

HPE	Holoprosencefalia
Ig	Inmunoglobulina
IGF2	Insulin Growth Factor 2
Ihh	Indian Hedgehog
Ihog	Interference hedgehog
Islet2	Insulin related protein 2
JNK	c-Jun N-terminal Kinase
Kif7/3a	Kinesis family member 7
LE	Lente
Lef	Lymphoid enhancer-binding factor 1
LRP2	Low density lipoprotein receptor-related 2
Myc	v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog
NF-AT	N Factor-Activation T cells
NF-M	Neurofilamento-M
NGL	Núcleo Geniculado Lateral
NGLd	Núcleo Geniculado Lateral dorsal
NO	Nervio Óptico
Noc	Nervio óptico contralateral
NrCAM	Neural Cell Adhesion Molecule
NTR	Netrin-related domain
PAX2	Paired box 2/6
PBS	Phosphate buffered saline
PBT	Phosphate buffer triton
PCOLCE	procolágeno C-proteinasa de tipo I
PCP	Planar Cell Polarity
PCR	Polymerase chain reaction
PFA	Paraformaldehído
PH3	Phospho-Histone 3
PKA	Protein Kinase A
PKC	Protein Kinase C
Ptc	Patched
Ptch1/2	Patched homologo 1/2
QO	Quiasma Óptico
qRT-PCR	quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
Rac	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RANKL	Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand
Rho	Ras homologue
RN	Retina Neural
Robo	Roundabout
ROCK	Rho associated protein kinase
Ror	Rar-related orphan receptor
Ryk	receptor-like tyrosine kinase
SDF1	stromal cell-derived factor 1
Sert	Serotonin transporter
SFRP	Secreted Frizzled-related protein
Shh	Sonic hedgehog

Abreviaturas

Smo	Smoothened
SNC	Sistema Nervioso Central
SuFu	Suppressor of fused
Tcf	T-cell Factor
TGF β	Transforming Growth Factor β
TIMP	Tissue Inhibitors of Metalloproteinases
TO	Tracto Óptico
TOc	Tracto Óptico contralateral
TOi	Tracto Óptico ipsilateral
Uml	Umleitung
Unc	Uncoordinated receptor
VT	Ventro Temporal
Wg	Wingless
WIF1	Wnt Inhibitory Factor
Wls	Wntless
WT	Wyld Type
Zic2	Zinc finger of cerebellum 2
ZMC	Zona del Margen Ciliar
ZVT	Zona Ventro-Temporal

Introducción



La embriogénesis temprana en vertebrados se divide en tres procesos principales: la segmentación, la gastrulación y la neurulación. La segmentación es el proceso en el cual el cigoto comienza a dividirse originando una serie de células denominadas blastómeros, los cuales en su conjunto formarán la blástula. Durante la gastrulación esos blastómeros presentan movimientos morfogenéticos, mediante los cuales se formará un embrión con tres capas celulares: el ectodermo, el mesodermo y el endodermo. Parte de este ectodermo se va a especificar como ectodermo neural gracias a las señales de un organizador denominado notocorda, dando lugar a una estructura denominada placa neural. Durante el proceso de neurulación, la placa neural se va a plegar sobre sí misma formando el tubo neural, el cual en su parte más anterior dará lugar a tres vesículas denominadas: prosencéfalo, mesencéfalo y rombencéfalo. El prosencéfalo durante el desarrollo dará lugar al telencéfalo y al diencéfalo, mientras que el rombencéfalo dará lugar al mielencéfalo y al metencéfalo. El resto del tubo neural formará la médula espinal. Durante la embriogénesis, las células de la placa neural darán origen a los diferentes tipos neuronales mediante distintos procesos que incluyen: la competencia, la especificación, la determinación y la diferenciación.

Las neuronas, una vez diferenciadas, son células muy especializadas y complejas. La diferenciación de la neurona comienza con la formación del axón y de las dendritas. El axón es la estructura de la neurona que permite la conexión con otras neuronas o células del organismo, como ocurre en la unión neuromuscular. Para la conexión entre la neurona y su célula diana, el axón puede tener que extenderse a largas distancias a través del embrión, como ocurre en el caso de una neurona motora o de una Célula Ganglionar de la Retina (CGR), o por el contrario formar sinapsis con neuronas cercanas. Durante este trayecto el axón es guiado por una serie de señales.

La guía axonal ha sido un proceso altamente estudiado y se conocen en profundidad los mecanismos moleculares subyacentes, pero todavía se sabe poco de cómo la adquisición de una determinada identidad neuronal influye en el crecimiento de su axón. Además, aunque se conocen muy bien los procesos de fasciculación de los axones, menos conocidos son los mecanismos que regulan su desfasciculación en aquellos segmentos donde este proceso es requerido, mecanismos que permiten a los axones crecer correctamente hasta sus células diana.

La vía visual es un modelo muy útil para estudiar la neurogénesis y la guía axonal. La retina ha sido una de las piezas claves para el estudio de la neurogénesis

Introducción

en el Sistema Nervioso Central (SNC) de vertebrados, mientras que el estudio de la formación de las conexiones de las CGR con sus células diana ha avanzado nuestro conocimiento en el campo de la guía axonal.

1.1 El sistema visual

El sistema visual es el encargado de captar y procesar señales lumínicas de nuestro entorno. En vertebrados, este sistema está compuesto por los ojos, los tractos visuales y los diferentes núcleos cerebrales encargados de la visión. El sistema visual de vertebrados comienza a formarse temprano en el desarrollo.

El ojo empieza a desarrollarse durante la gastrulación con la formación de un campo de ojo en la placa neural anterior. Las células del campo de ojo van a evaginar lateralmente dando lugar a dos vesículas ópticas en la parte más distal, y a dos tallos ópticos que conectan con el prosencéfalo (Fig. 1A). Los tallos ópticos se diferenciarán en etapas posteriores del desarrollo en la glía del nervio óptico. La regionalización de la parte distal y proximal está definida por la expresión de dos factores de transcripción con dominios homeobox: Pax6, cuya expresión se da en la parte más distal de la vesícula óptica y determina la retina neural (RN) y el epitelio pigmentario de la retina (EP); y Pax2, que se expresa en la parte proximal y determina el tallo óptico (Chow and Lang, 2001; Esteve and Bovolenta, 2006).

La retina neural presuntiva se sitúa en la parte más distal de la vesícula óptica, estando así en contacto con el ectodermo superficial. La señalización recíproca entre el ectodermo superficial y la vesícula óptica produce la inducción de la placoda de la lente. Las vesículas ópticas van a invaginar dando lugar a dos estructuras con forma de copa, las cuales están compuestas por dos capas celulares (Fig. 1B, C). La región ventral de las copas y tallos ópticos va a invaginarse originándose la fisura coroidea. Esta fisura es por la cual se introducen las células mesenquimales, que formarán la arteria hialoidea, y salen los axones de las CGR. La fisura coroidea es una estructura transitoria que acabará fusionándose en la región de transición entre la RN y el tallo óptico, dando lugar al disco óptico (DO) (Chow and Lang, 2001).

Una vez la copa óptica se ha formado, las células de la RN presuntiva comienzan a proliferar y a diferenciarse, siguiendo un movimiento nuclear intercínético característico de los neuroepitelios. La diferenciación de los diferentes tipos neuronales en la retina se realiza de manera secuencial, siendo las primeras neuronas en diferenciarse las CGR (Fig1 E-F). Posteriormente se diferencian el resto de tipos neuronales, en un orden que parece depender de la especie (Kitambi and Malicki,

2008; Young, 1985). La retina neural acabará compuesta de seis tipos neuronales: los fotorreceptores (conos y bastones), las células amacrinas, bipolares, horizontales y las CGR, además de un tipo de célula glial denominado glía de Müller (Fig. 2) (Cepko, 2014; Cepko et al., 1996).

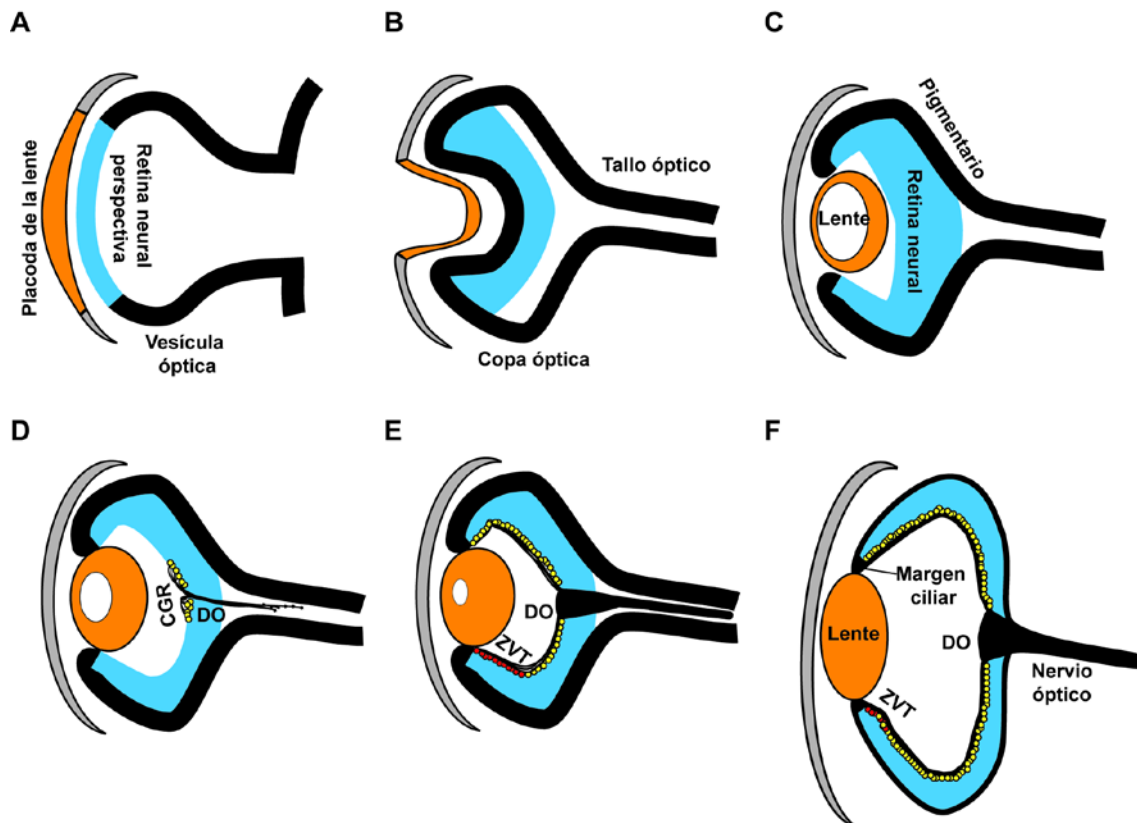


Figura 1. Esquema del desarrollo del ojo y diferenciación de las CGR.

A-F) Dibujo representativo de las principales etapas de formación del ojo. En naranja se puede observar la formación de la lente en su fase de placoda de la lente (**A**), vesícula de la lente (**C-E**), hasta una lente completamente formada (**F**). **A-F)** En azul observamos la formación de la retina desde la vesícula óptica (**A**) hasta una retina completa (**F**). Los círculos amarillos y rojos representan las CGR, que comienzan a diferenciarse en regiones centrales (**D**) y siguen diferenciándose hacia regiones periféricas (**E,F**), en amarillo están representadas las CGRc y en rojo las CGRi, nótese que a estadios tardíos en la ZVT se mezclan CGRc y CGRi (**F**).

La diferenciación conlleva el posicionamiento de los diferentes tipos neuronales en capas, dando a la retina neural un aspecto laminado. La capa más interna está compuesta por los somas de las CGR y de algunas amacrinas desplazadas. La capa intermedia, denominada capa nuclear interna, presenta los somas de las células amacrinas, bipolares, horizontales y de la glía de Müller. Finalmente, se halla una capa nuclear externa, la cual se compone por el soma de los fotorreceptores (conos y bastones) (Fig. 2). Según se diferencian los diferentes tipos neuronales se establecen conexiones entre ellos, lo que permitirá un correcto funcionamiento de la retina (Cepko, 2014).

Introducción

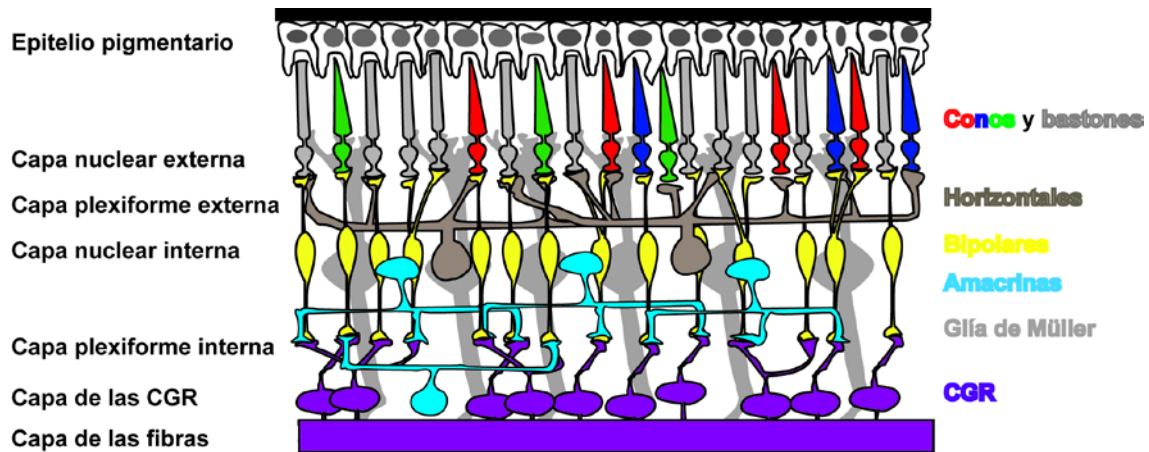


Figura 2. Estructura de la retina de mamíferos.

Las células de la retina (derecha) se van a ordenar de una forma determinada dando lugar a una estructura laminar que consta de diferentes capas (izquierda).

La retina es la encargada de captar la señal lumínica a través de los fotorreceptores, los cuales la convierten en señal nerviosa que será modulada por los diferentes tipos neuronales de la retina. Las CGR son las encargadas de transmitir esta información al cerebro a través de sus axones (Erskine and Herrera, 2007, 2014).

Los axones de las CGR crecen dentro de la retina a través de la capa de las fibras. Estos axones convergen en el Disco Óptico (DO), estructura por la cual abandonan la retina. Los axones de las CGR una vez abandonan la retina se fasciculan formando el Nervio Óptico (NO), estructura en la cual crecerán hasta regiones ventrales del cerebro. Es en este lugar donde cruzarán la línea media para dirigirse a sus dianas. Los axones provenientes de ambos ojos se cruzan formando una estructura en forma de X denominada Quiasma Óptico (QO). Tras cruzar la línea media estos axones se empaquetan formando el Tracto Óptico (TO), a través del cual crecerán hasta llegar a sus neuronas diana en el Núcleo Geniculado Lateral del tálamo (NGL) y el Tectum (conocido en mamíferos como Colículo Superior, CS) (Erskine and Herrera, 2007, 2014) (Fig.3). A su vez las neuronas del NGL establecen conexiones con neuronas de la corteza visual primaria, la cual procesará la información (Fig.3) (Erskine and Herrera, 2007, 2014).

El QO es una región clave, en la cual los axones de las CRG toman la decisión de cruzar la línea media y proyectar contralateralmente, o por el contrario no cruzarla y proyectar ipsilateralmente en los núcleos cerebrales (Fig.3) (Erskine and Herrera, 2007, 2014).

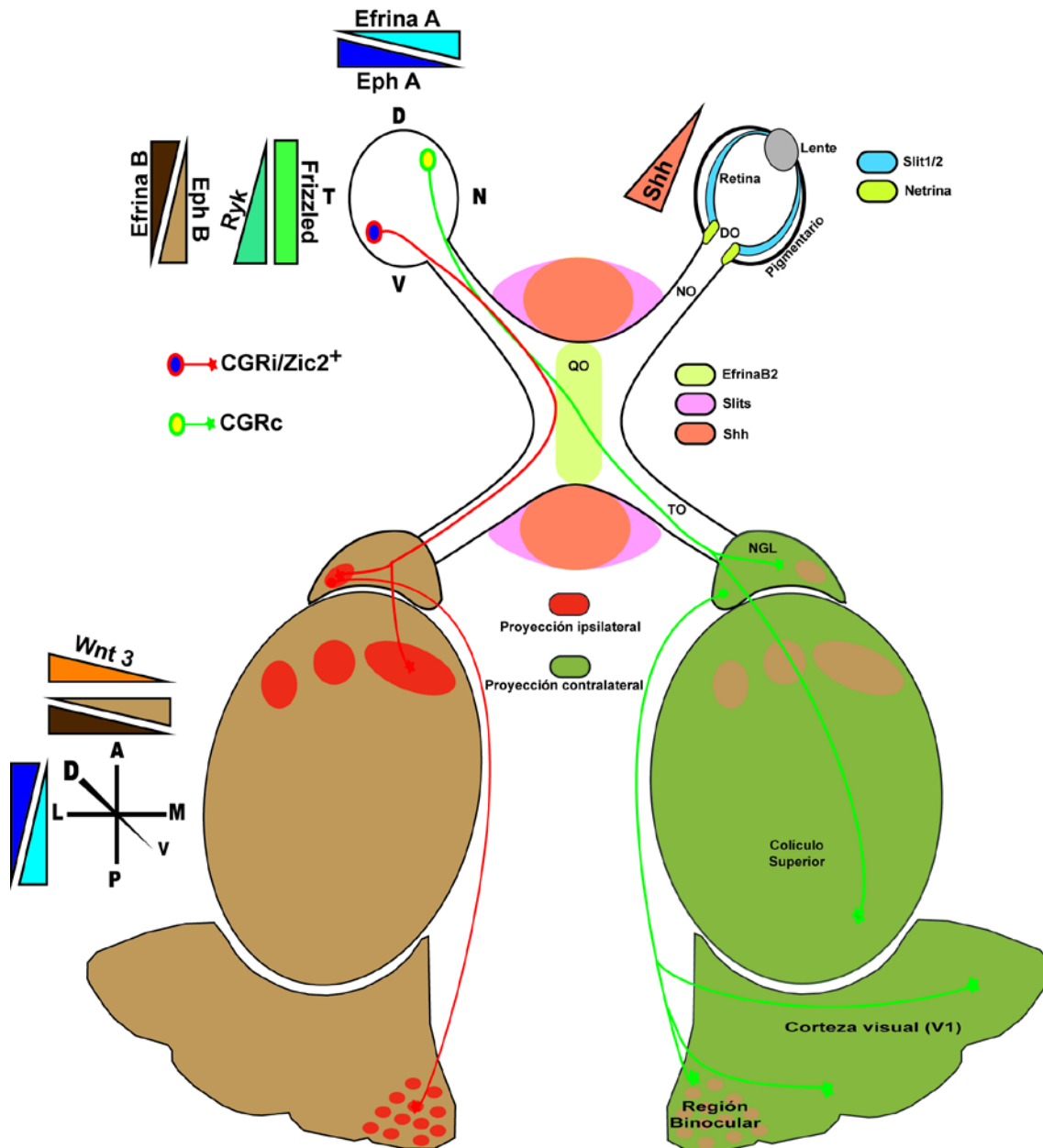


Figura 3. Esquema de la vía visual de ratón con las diferentes señales de guía axonal.

Esquema representativo de la vía visual, marcando la retina, el NO, el QO, NGL, CS y corteza visual (de arriba abajo). En rojo observamos la proyección ipsilateral y en verde la contralateral. El ojo izquierdo muestra las regiones de la retina, nótese que las CGRi (azul) se generan solo en la ZVT y se caracterizan por ser $Zic2^+$. El ojo derecho muestra las principales señales que guían a los axones de las CGR dentro de la retina. A nivel de QO podemos observar algunas de las señales responsables de la correcta guía de los axones, remarcando en la línea media la expresión de EfrinaB2 (amarillo claro) responsable de repeler a los axones de las CGRi. Bordeando el QO observamos la expresión de Slits y Shh (Rosa y rojo claro). En la parte izquierda se han representado los diferentes gradientes de expresión de diferentes moléculas de guía axonal (triángulos indican gradiente de concentración, rectángulo concentración homogénea), responsables de la topografía de las proyecciones.

Introducción

Los vertebrados presentan diferentes tipos de visión dependiendo de la presencia o ausencia de proyecciones ipsilaterales. Existe una visión panorámica, característica de peces y aves, la cual se determina por el cruce de todos los axones de las CGR a nivel de QO. Por el contrario, existe una visión binocular, caracterizada por la presencia de CGR que proyectan ipsilateralmente. El ratón presenta una visión binocular reducida también considerada semi-panorámica, en la cual tan solo un 3-5% de sus CGR (dependiendo de la cepa) proyectan ipsilateralmente. En cambio organismos como los humanos presentan una visión binocular completa y la proporción de las CGR que proyectan ipsilateralmente es de un 40% (Erskine and Herrera, 2007, 2014; Jeffery and Erskine, 2005).

Nuestro laboratorio está interesado en conocer cómo se producen los procesos de especificación de las CGR en la retina, y cómo adquieren identidades contralaterales o ipsilaterales que influyen en el crecimiento de sus axones.

1.2 Especificación de las CGR

Como ya hemos visto, la neurogénesis en la retina comienza durante el estadio de copa óptica con la diferenciación de las CGR (Austin et al., 1995; Cepko et al., 1996; Esteve and Bovolenta, 2006). En vertebrados, FGF parece tener un papel central en desencadenar la diferenciación de las CGR (Martinez-Morales et al., 2005), caracterizada por la expresión del factor de transcripción bHLH, *ath5*, el cual es clave en la especificación de los progenitores de las CGR (Chen et al., 2013).

FGF inicia así la diferenciación de las primeras CGR (Martinez-Morales et al., 2005), las cuales expresan Shh (Jensen and Wallace, 1997). Shh secretado por las CGR está implicado en la proliferación y diferenciación de la retina, determinando el correcto número de CGR (Esteve and Bovolenta, 2006; Jensen and Wallace, 1997; Levine et al., 1997; Neumann and Nusslein-Volhard, 2000). En la retina de vertebrados, bajos niveles de Shh promueven la expresión de genes proneurales como *ath5* (*Math5* en ratón) especificando los progenitores de las CGR (Mu et al., 2005; Shkumatava and Neumann, 2005; Zhang and Yang, 2001a). En cambio, altos niveles de Shh inhiben la expresión de *Ath5*, regulando negativamente la especificación de progenitores de CGR (Zhang and Yang, 2001a). Durante el proceso de diferenciación se generan diferentes tipos de CGR atendiendo a su morfología, función o proyección entre otras características. Si atendemos a su tipo de proyección, en ratón, la vasta mayoría se van a diferenciar como CGR contralaterales (CGRc), mientras que una pequeña población situada en la región ventro-temporal se diferenciará como ipsilaterales (Fig. 2E,F) (Drager, 1985).

La identidad ipsilateral de las CGRi (CGR ipsilaterales) viene determinada por la expresión de *Zic2*, un factor de transcripción con motivos de dedos de Zinc, cuya expresión se activa en la región ventro-temporal de la retina a estadio E14 en ratón (Herrera et al., 2003). *Zic2* activa la expresión de efectores de ipsilateralidad como son *EphB1* y el transportador de la serotonina (*Sert*) (Garcia-Frigola et al., 2008; Garcia-Frigola and Herrera, 2010; Lee et al., 2008). Otra de las características de las CGRi es la ausencia de expresión de *Shh*, aunque presentan la expresión de Boc, uno de los receptores de Shh (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008).

En la región VT no solo se encuentran CGRi, sino que también hay una población de CGRc (Fig. 2F). La población de CGRc situadas en la región VT del ratón, se genera en torno a E17.5, y proyecta en la parte más dorsal del NGL dorsal (NGLd) (Drager, 1985; Drager and Olsen, 1980). Estas CGRc tardías se diferencian de las CGRi por la expresión de *Islet2* y *Shh* (Pak et al., 2004). Se ha visto que en ausencia del factor de transcripción *Islet2* en la región VT de la retina, hay una mayor expresión de *Zic2* en VT, activándose el programa ipsilateral en todas las CGR de la región VT (Pak et al., 2004).

La señalización de Shh es una pieza clave en la correcta generación de las CGR. Pero se desconoce si tiene un papel en la diferenciación de las CGRi.

1.3 Señalización de Hedgehog

La familia de los Hedgehog (Hh), cuyo miembro fundador fue descubierto en un análisis de mutantes de *Drosophila*, cuyas larvas mostraban una alteración en el patrón segmental ocasionando una morfología similar a un erizo (Nusslein-Volhard and Wieschaus, 1980). Esta vía de señalización es reutilizada durante la vida de un organismo, y presenta múltiples efectos específicos; además, su desregulación está relacionada con diversas patologías que abarcan desde malformaciones en el desarrollo hasta ciertos tipos de cáncer (Pandolfi and Stecca, 2015).

La vía de señalización de Hh está altamente conservada entre *Drosophila* y vertebrados (Goodrich et al., 1996). En las células productoras de Hh, la proteína se auto-procesa generándose una porción N-terminal denominada Hh-N y otra C-terminal llamada Hh-C. El fragmento Hh-N se modifica con la unión covalente de un palmitilo en su región N-terminal y un colesterol en su región C-terminal, conociéndose dicha molécula con el nombre de HhN-p. Estas modificaciones lipídicas hacen que HhN-p presente una alta afinidad por la membrana plasmática, siendo necesarias para una eficiente secreción (Beachy et al., 1997). Esta secreción se produce mediante la

Introducción

acción de Dispatched, una proteína con 12 dominios transmembrana de la familia de los transportadores bacterianos RND (*resistance-nodulation-cell division*) (Burke et al., 1999; Callejo et al., 2011; Caspary et al., 2002; Couso, 2011; Nakano et al., 2004).

Patched (Ptc) es el receptor de Hh (Hooper and Scott, 1989; Nakano et al., 1989). En ausencia de Hh, este receptor con 12 dominios transmembrana inhibe a Smoothened (Smo), un regulador positivo de la vía de Hh. Smo consta de siete dominios transmembrana y una gran homología con receptores acoplados a proteínas G (GPCRs) (Alcedo et al., 1996; van den Heuvel and Ingham, 1996). Cuando la ruta se encuentra inactiva, el factor de transcripción Cubitus interruptus (Ci) se fosforila y es procesado por el proteasoma, generándose así la forma represora de la transcripción. Cuando Hh se une a Ptc se produce la activación de Smo, el cual desencadena una casacada intracelular que evita la proteólisis Ci. La forma completa de Ci se translocará al núcleo activando la transcripción de genes diana (Fig. 4A) (Briscoe and Therond, 2013; Hui and Angers, 2011).

En mamíferos, se conocen tres homólogos de Hh de *Drosophila*: Sonic Hedgehog (Shh), Desert Hedgehog (Dhh) e Indian Hedgehog (Ihh). Todos ellos son, como Hh, proteínas secretables cuya misión principal es actuar como moléculas señalizadoras, especificando distintas regiones durante el desarrollo embrionario, y regulando la homeostasis en los tejidos adultos (Ingham and McMahon, 2001; Marti and Bovolenta, 2002).

Shh se expresa durante el desarrollo temprano del SNC (Sistema Nervioso Central) de vertebrados en la placa del suelo y la región ventral del prosencéfalo; y más tardíamente se expresa también en otras estructuras como son las células ganglionares de la retina, la corteza o el cerebelo. Shh ha sido también altamente estudiado por sus funciones morfogénicas, actuando durante el desarrollo en algunos centros organizadores como son la notocorda, la placa precordal o la zona de actividad polarizante de las extremidades (Chang et al., 1994; Echelard et al., 1993; Harwell et al., 2012; Jensen and Wallace, 1997; Krauss et al., 1993; Marti and Bovolenta, 2002; Riddle et al., 1993; Roelink et al., 1994). En vertebrados, a diferencia de *Drosophila*, se ha descrito que la liberación de Shh implica la acción de diversas moléculas, siendo necesaria la acción de Dispatched, Scube2 y posiblemente de la actividad de metaloproteasas de la familia de las ADAMs, que junto con proteoglicanos de la matriz extracelular como el heparán sulfato, cooperan para la liberación de un morfógeno soluble y activo biológicamente (Dierker et al., 2009; Jakobs et al., 2014; Nakano et al., 2004; Ohlig et al., 2011).

En vertebrados, existen dos homólogos de Ptc, Ptch1 y Ptch2 (Briscoe and Therond, 2013); además de 3 homólogos de Ci denominados Gli1, Gli2 y Gli3 (Hui and Angers, 2011). Al igual que Ci, Gli2 y Gli3 son factores de transcripción que pueden modificarse postraduccionalmente, mientras que por el contrario Gli1 no presenta dichas modificaciones y actúa siempre como activador. En vertebrados, la transducción de la señalización de Hh implica al cilio primario, el cual es un apéndice celular no móvil constituido principalmente por microtúbulos. La ausencia de Hh provoca la formación de un complejo constituido por la kinesina Kif7 y la kinasa SuFu que se unen a Gli2/3. La formación de este complejo promueve el procesamiento de Gli2/3 en la base del cilio primario, mediante la fosforilación en sus dominios carboxi-terminales por acción de las kinasas *Protein Kinase A* (PKA), *Glycogen Synthase 3-β* (GSK3-β) y la *Casein Kinase I* (CKI). Estas fosforilaciones catalizan la ubiquitinización y posterior degradación parcial por parte del proteasoma de Gli2/3, generando así las formas represoras de los Gli (Fig. 4B) (Hui and Angers, 2011). En cambio la presencia de los Hh, promueve la activación de Smo y su transporte al cilio primario (proceso dependiente de la actividad de la proteína motora Kif3a y de β-arrestin). Smo activo y localizado en el cilio primario, promueve la disociación del complejo Gli2/3-Kif7-SuFu permitiendo la translocación al núcleo de Gli2/3 en su forma completa y, por tanto, activadora. La activación de la vía de los Hh desencadena la transcripción de genes diana como Ptch1, el cual atenuará la señalización de Hedhehog, y Gli1, que amplificará dicha señalización (Fig. 4B). Además, se ha visto que la vía de Hh activa diversos genes reguladores de ciclo celular como son las ciclinas D/E, Myc e IGF2 (Insulin like Growth Factor 2) en células troncales y procesos tumorales (Briscoe and Therond, 2013; Hui and Angers, 2011).

Como se puede ver, la señalización de los Hh es un proceso complejo. La activación de sus genes diana depende de la concentración y el tiempo al cual la célula receptora esté sometida al morfógeno (Dessaud et al., 2007; Pages and Kerridge, 2000). Además, en la última década se han descubierto en *Drosophila* una serie de moléculas como Boi (Brother of Ihog) e Ihog (Interference Hedhehog) que modulan la señalización de los Hh a diferentes niveles (Beachy et al., 2010).

Boi e Ihog son dos proteínas transmembrana descritas como responsables, junto con Ptc, de unir Hh y permitir así la formación de un hetero-receptor de alta afinidad para Hh (Camp et al., 2010). Además, se ha visto que Ihog y Boi están implicados en la formación del gradiente de Hh en *Drosophila* (Bilioni et al., 2013). En vertebrados Boc y Cdon (moléculas homólogas de Boi e Ihog, respectivamente) son capaces de modular la señalización de Hh. Aunque no son las únicas implicadas en la

Introducción

modulación de la señalización de los Hh en vertebrados, ya que existen otras moléculas como Gas1, Hhip, LRP2 (también conocido como megalin), o Scube2 (Allen et al., 2007; Cardozo et al., 2014; Jakobs et al., 2014; McCarthy et al., 2002; McLellan et al., 2008).

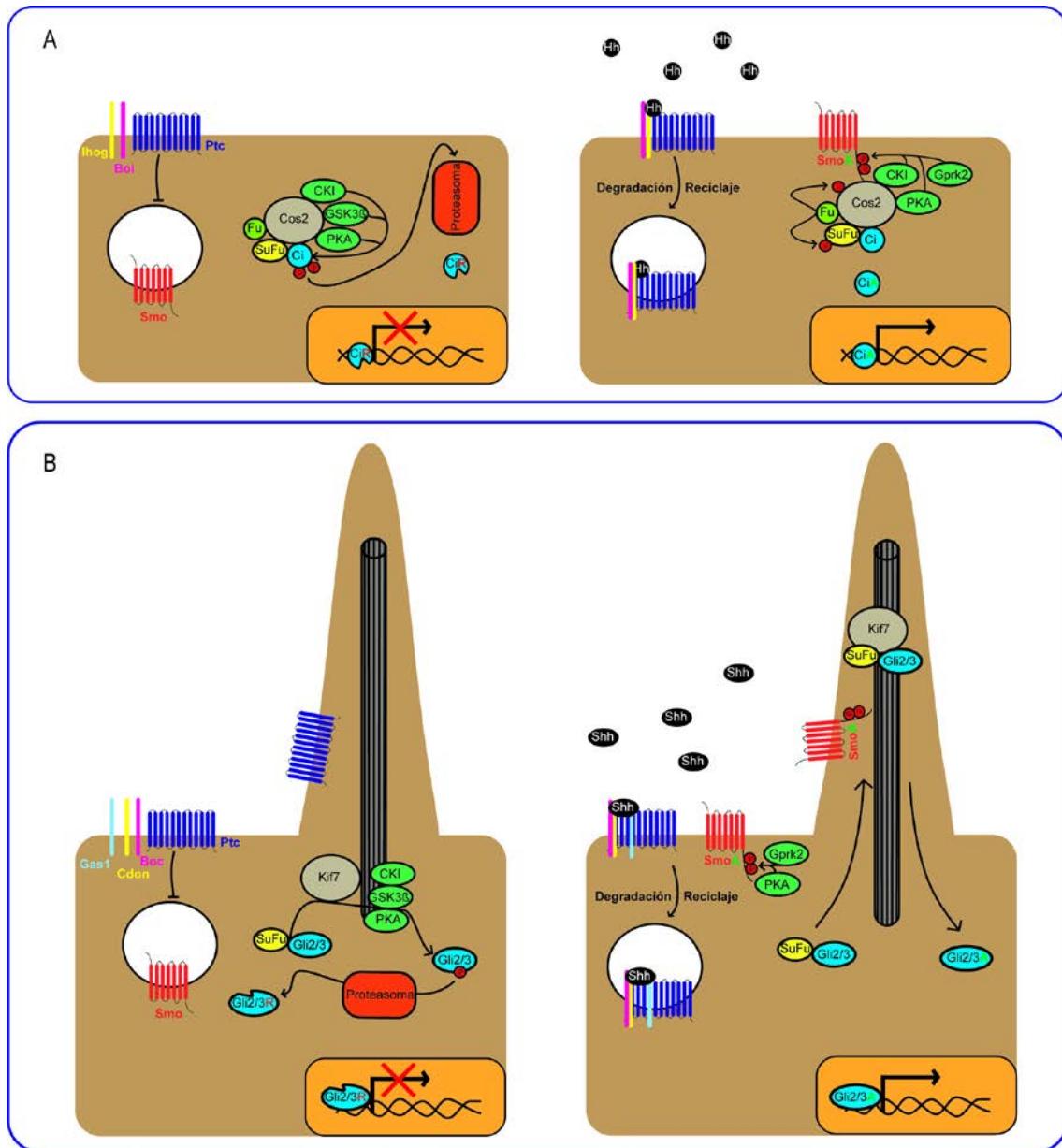


Figura 4. Ruta de señalización de los Hh.

La ruta de señalización de Hh está altamente conservada entre *Drosophila* y vertebrados. **A)** En *Drosophila* la ausencia del ligando Hh promueve la proteólisis de Ci y la formación de la forma represora de Ci (izquierda). La presencia de Hh promueve la estabilización de la forma completa de Ci, el cual se transloca al núcleo y promueve la transcripción de genes diana de la vía. **B)** En mamífero el cilio primario es clave en la señalización de Hh, al igual que en *Drosophila* la ausencia del ligando promueven la proteólisis de Gli2/3 formándose Gli2/3-R (izquierda).

A lo largo de los años se han propuesto varios mecanismos que explican la formación del gradiente de Hh y cómo esta molécula se mueve a largas distancias.

Estos mecanismos incluyen difusión pasiva, transporte activo y/o movimientos de transcitosis. Además recientemente en el disco imaginal de ala de *Drosophila*, se ha descrito que la generación del gradiente a larga distancia implica a unas extensiones de la membrana plasmática denominadas citonemas, que permiten modular la difusión del morfógeno (Gradilla et al., 2014; Kornberg, 1999; Ramirez-Weber and Kornberg, 1999). En vertebrados, también se han descrito estructuras similares a los citonemas en el transporte de Shh en el desarrollo temprano de la extremidad de pollo y en la vesícula óptica del pez cebra, en dichas estructuras están presentes Boc y Cdon (Cardozo et al., 2014; McMahon and Hasso, 2013; Sanders et al., 2013).

Boc se expresa en las CGRi y podría presentar una función clave en la señalización de Shh en estas células.

1.4 Brother Of Cdon (Boc)

Boc es una glicoproteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de moléculas de adhesión con dominios de tipo inmunoglobulina. Posee un único dominio transmembrana, una región intracelular y un ectodominio formado por cuatro dominios de tipo inmunoglobulina y tres dominios fibronectina de tipo III (Fig. 5A) (Kang et al., 2002).

El RNA mensajero de *Boc* se aisló por primera vez a través de ADN copia de cerebro fetal humano, pero su distribución en el embrión de vertebrados abarca varios tejidos y estadios, desde gástrula hasta organismo adulto. Generalmente, *Boc* se localiza en dominios proliferativos y en células indiferenciadas, caso en el que *Boc* suele co-expresarse con su homólogo *Cdon*. Este hecho sugiere una posible cooperación o redundancia entre ambas proteínas. Pero *Boc* y *Cdon* se localizan también de manera aislada, indicando su capacidad para desarrollar funciones específicas (Bergeron et al., 2011; Izzi et al., 2011; Kang et al., 2002; Mulieri et al., 2002; Mulieri et al., 2000; Okada et al., 2006).

En estadios tempranos de desarrollo de vertebrados, Boc se expresa en los pliegues de la cabeza, somitas, pulmones, sistema digestivo y urogenital, primordio de la extremidad, tubo neural dorsal, oído interno, aparato olfativo y en el desarrollo del ojo. En estadios posteriores *Boc* se localiza en progenitores corticales del telencéfalo, el hipocampo prospectivo, el tálamo dorsal, epítálamo, el colículo superior e inferior, y en los progenitores del rombencéfalo (Aglyamova and Agarwala, 2007; Bergeron et al., 2011; Connor et al., 2005; Harwell et al., 2012; Mulieri et al., 2002).

Introducción

La expresión de *Boc* y su homólogo *Cdon* podría estar controlada por la actividad de la vía de Shh, ya que, existen evidencias de que en estadios tempranos del desarrollo de vertebrados, la activación de la vía de Shh, tanto en tubo neural como en el primordio de las extremidades, provoca una bajada en los niveles de expresión de *Boc* y *Cdon* (Tenzen et al., 2006). Aunque, por el contrario, existen indicios de que la activación de la vía de Shh provoca un aumento de la expresión de *Boc*, como ocurre en los precursores de las células granulares del cerebelo (Mille et al., 2014). Es decir, la vía de Shh podría regular positiva y negativamente los niveles de expresión de *Boc* y *Cdon*, observándose un bucle señalización que requiere de una regulación muy estricta.

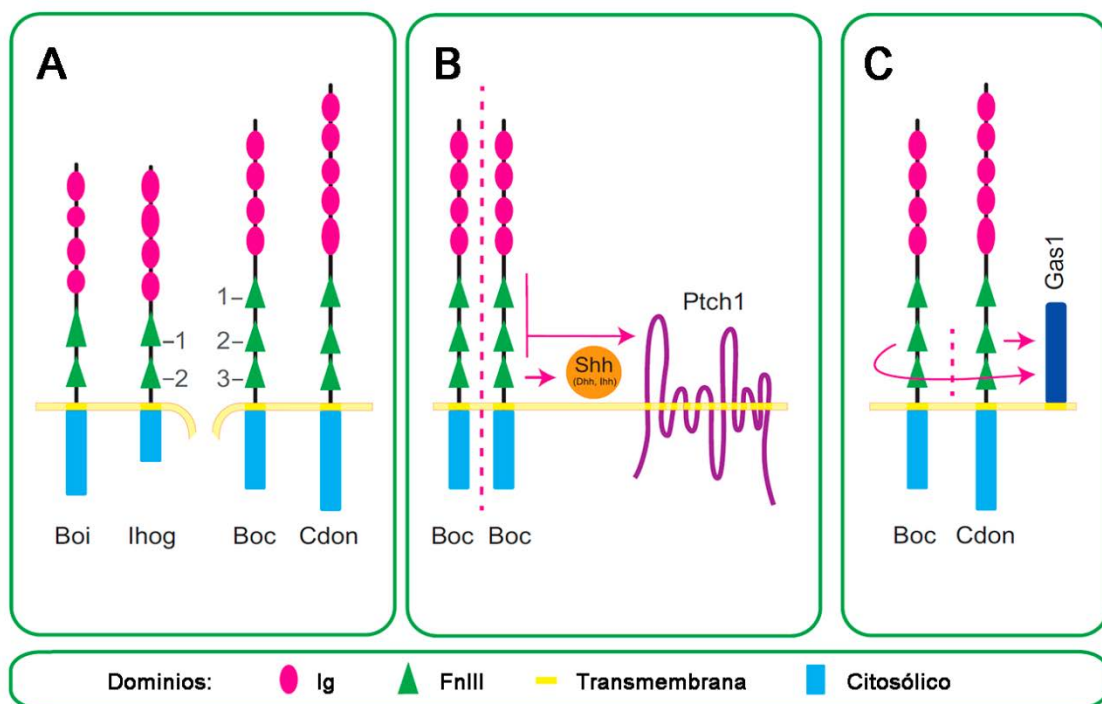


Figura 5. Diagrama de la estructura molecular de Boc y sus interacciones.

A) Comparación esquemática de los dominios de Boc y Cdon con sus homólogos en *Drosophila*, Boi e Ihog. Los números marcan la posición de los dominios fibronectina tipo III. **B)** Boc puede interactuar consigo mismo formando homodímeros, y con Hh y el receptor Ptch1. **D)** Boc puede interactuar con Cdon y Gas1 formando heterocomplejos. Las líneas discontinuas marcan interacciones. La leyenda inferior indica el tipo de dominios. Modificación de una figura original del Dr. Marcos J. Cardozo.

Boc forma complejos homofílicos y heterofílicos con su homólogo Cdon (Kang et al., 2002) y con Ptch1 (el receptor de Shh). Además, Boc puede interactuar también con otras moléculas capaces de unir Shh como es la proteína transmembrana Gas1 (Fig. 5B, C) (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011; Izzi et al., 2011).

En vertebrados, los hetero-complejos de Ptch1 con Boc, Cdon y/o Gas1 también se han descrito como potenciadores de la señalización de los Hh, ya que, al

igual que en *Drosophila*, la formación de estos complejos aumenta la afinidad del ligando por el receptor (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011; Izzi et al., 2011; Mille et al., 2014; Tenzen et al., 2006). En ratón y humano, mutaciones en *Cdon* genera fenotipos de holoprosencefalia (HPE), enfermedad congénita caracterizada por defectos en la línea media del prosencéfalo asociados a un fallo en la señalización de Shh. La falta de función simultánea de *Boc*, *Cdon* y *Gas1* durante el desarrollo causa letalidad perinatal, mostrando graves defectos de HPE similares a los ocurridos en la ausencia de la señalización de Shh. La similitud en los fenotipos, indica cierta redundancia en las funciones de *Boc*, *Cdon* y *Gas1* en ratón (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011; Seppala et al., 2014; Tenzen et al., 2006).

Este solapamiento que se observa en las funciones de *Boc*, *Cdon* y *Gas1* en ratón, no parece estar conservado en el pez cebra. En este organismo la sola ausencia de *Boc* en el mutante denominado *umleitung (uml)*, es suficiente para causar defectos del patrón ventral del tubo neural, somitas y mandíbula superior (Bergeron et al., 2011).

En *Drosophila*, *Boi* e *Ihog* se encuentran presentes en los citonemas de las células secretoras favoreciendo la generación del gradiente baso-lateral de Hh en el disco imaginal de ala (Bilioni et al., 2013). En el disco imaginal de ala de *Drosophila* *Boi*, junto con el glicoproteína Dally (DII), atrapa Hh secretado apicalmente evitando así su dispersión apical, y favoreciendo el reciclaje dentro de la propia célula secretora. Una vez reciclado, se produce el transporte de Hh en la región baso-lateral a través de los citonemas de la célula secretora, formándose así un gradiente (Bilioni et al., 2013; Callejo et al., 2011).

Así pues, *Boi* se ha descrito en *Drosophila* como un regulador positivo de la vía de Hh. Pero también existen evidencias que sugieren que *Boi* presenta un papel como regulador negativo de la señalización dependiente de Hh. Por ejemplo, en el ovario de *Drosophila*, las células troncales foliculares proliferan en respuesta al Hh secretado por las células apicales. Cuando *Boi* se expresa en las células apicales secuestra Hh, inhibiendo así la proliferación de las células troncales foliculares (Hartman et al., 2010). En este mismo sentido, *Cdon* en vertebrados ha sido descrito como un regulador negativo de la señalización de Shh, actuando en el desarrollo del ojo de pez cebra como un secuestrador de Shh evitando así la activación de la vía de Shh (Cardozo et al., 2014).

Boc se ha relacionado con la guía de los axones de las neuronas comisurales, actuando como receptor de Shh secretado por la placa del suelo y

Introducción

guiando los conos de crecimiento de las neuronas comisurales hacia la línea media (Okada et al., 2006). En este proceso de guía axonal se han implicado a kinasas de la familia Src, las cuales provocan una serie de modificaciones en el citoesqueleto del cono de crecimiento de manera independiente de Smo (Yam et al., 2009).

Boc presente en los conos de crecimiento de las CGRi podría tener un papel en la guía de los axones como ha sido propuesto por Fabre et al. (2010).

1.5 Guía axonal

Los axones, mediante el cono de crecimiento, interpretan la información de las moléculas de guía axonal, generándose así un crecimiento correcto hacia sus células diana (Erskine and Herrera, 2007, 2014; van Horck et al., 2004).

El cono de crecimiento es una estructura sensitiva muy dinámica situada en el extremo del axón de la neurona. Dicho cono presenta dos tipos de procesos de la membrana plasmática, unos más alargados y finos con forma de dedos denominados filopodios, y otros más anchos con forma de lámina denominados lamelipodios. Los conos de crecimiento responden a las moléculas de guía axonal gracias a receptores que presentan en su superficie. En este sentido, las moléculas de guía axonal pueden tener la capacidad de atraer al axón hacia la fuente de la señal; o por el contrario repelerlo, provocando el crecimiento del axón en dirección contraria (Dickson, 2002; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009; van Horck et al., 2004). Una misma señal puede ser atractante o repulsiva, dependiendo de los receptores que en ese momento se encuentren en la superficie del cono de crecimiento (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009). Los movimientos de atracción o repulsión son mediados por cambios en el citoesqueleto del cono de crecimiento, lo cual determinará la dirección de crecimiento del axón. Esto es debido a que las moléculas de guía axonal desencadenan cascadas de señalización que promueven cambios en algunos mediadores intracelulares, como son los nucleótidos cíclicos (cAMP o cGMP), iones de Ca^{2+} y/o la fosforilación de proteínas del citoesqueleto (van Horck et al., 2004).

Existen diversas familias de moléculas de guía axonal como son las parejas ligando/receptor: Efrinas/Eph, DCC/Netrinas/Unc, Slits/Robos, Semaforinas/Neuropilinas/Plexinas entre otras, las cuales han sido altamente estudiadas y se conoce muy bien sus mecanismos de acción (Erskine and Herrera, 2007, 2014). Más recientemente, se ha visto que morfógenos como Shh, Wnt o TGF β /BMP no solo regulan la proliferación celular y su diferenciación, sino que también juegan un importante papel en la generación de los circuitos neuronales

mediante la guía de los axones, desencadenando un mecanismo intracelular que provoca cambios rápidos en el citoesqueleto del cono (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009).

La matriz extracelular es otro componente implicado en la guía de los axones, moléculas como la laminina o la tenascina favorecen o inhiben el anclaje del cono de crecimiento, permitiendo o evitando el crecimiento del axón, dependiendo de las propias moléculas de adhesión que se localicen en el cono de crecimiento (Becker et al., 2003; Cohen et al., 1987).

La función de las moléculas de adhesión en la guía de los axones no se limita al anclaje del cono de crecimiento. Durante el crecimiento axonal, los axones se adhieren unos a otros formando fascículos. Moléculas de adhesión como las integrinas o caderinas llevan a cabo el control de la fasciculación de estos axones (Bao, 2008; Van Vactor, 1998). Los procesos de fasciculación y desfasciculación deben de ser coordinados para permitir a los axones proyectar en sus dianas. Cómo se controlan estos procesos aún no está claro. Las metaloproteasas son capaces de modificar la adhesión celular mediante el procesamiento de moléculas como L1 o N-cadherina.

Los mecanismos de guía axonal pueden regular la adhesión celular y por tanto también la fasciculación de las fibras mediando el crecimiento de los axones de las CGR hacia sus dianas.

1.6 Guía axonal de las CGR

Los axones de las CGR se extienden dentro de la retina a través de la capa de las fibras hasta llegar al DO, en este trayecto el ligando Slit, expresado en retina y lente, junto con su receptor Robo2, expresado en las CGR, hacen que los axones crezcan correctamente dentro de esta capa (Erskine and Herrera, 2014). Además el morfógeno Shh presenta un gradiente de concentración, alto en la retina central y bajo en la periferia, que promueve la extensión de los axones de las CGR dentro de la retina (Erskine and Herrera, 2014) (Fig.3). Junto con estas moléculas de guía también actúan moléculas de adhesión, como L1, NrCAM y SC1, las cuales favorecen el correcto crecimiento dentro de la capa de las fibras. La netrina expresada en el DO atrae a los axones de las CGR, los cuales expresan el receptor DCC. En el pez cebra otras moléculas expresadas en el DO como la citoquina SDF1 y su receptor CXCR4, presente en los conos de crecimiento, favorecen la extensión de los axones hacia el DO (Erskine and Herrera, 2014; Li et al., 2005a).

Introducción

Una vez los axones de las CGR abandonan la retina crecen a través del NO, lugar donde las células de glía mediante señales inhibitorias (SemaA5 y Slit2) ayudan a agrupar a los axones. Además, moléculas de adhesión como L1 están implicadas en la fasciculación de los axones a nivel de NO (Erskine and Herrera, 2014; Lyckman et al., 2000). Los axones agrupados en el NO llegan al QO, lugar donde las células del borde del quiasma expresan Slit1 y Slit2 que repelen los axones. Además, en los bordes del quiasma existe una alta expresión de Shh, molécula que restringe los axones en el eje antero-posterior a nivel de QO (Fig. 3) (Erskine and Herrera, 2014; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). La vía de Wnt está también implicada en la guía de los axones a este nivel. Se ha observado en pez cebra, que los mutantes en la proteína APC1 presentan fallos en la guía de los axones a nivel de QO (Paridaen et al., 2009).

Como hemos visto con anterioridad no todos los axones de las CGR van a cruzar la línea media. Los de las CGRi de organismos con visión binocular presentan un comportamiento diferente a nivel de QO que los de las CGRc. Esto es debido a la presencia en sus conos de crecimiento del receptor EphB1, cuya expresión es activada por Zic2. Las células gliales del quiasma óptico expresan *EfrinaB2*, la cual va a provocar una señal de repulsión en los conos de crecimiento que presenten el receptor EphB1, forzando su crecimiento en el TO ipsilateral (Fig. 3) (Garcia-Frigola et al., 2008; Williams et al., 2003). Además del receptor EphB1, las CGRi presentan en sus conos de crecimiento el receptor Boc, el cual podría tener un papel en la generación de ipsilateralidad (Fabre et al., 2010).

Los axones continúan creciendo a través del TO hacia sus dianas en el cerebro, en cuyo trayecto van a jugar un papel importante la señalización de Slit/Robo (Erskine and Herrera, 2014). Además de esta señalización, se ha visto un papel importante de moléculas de adhesión como la N-Caderina y la β 1-integrina (Rhee et al., 2002; Stevens and Jacobs, 2002).

Una vez los axones llegan al NGL y al CS van a proyectar de manera precisa. Las efrinas y sus receptores regulan la organización retinotópica de las proyecciones en el eje dorso-ventral y antero-posterior. En la generación de esta segregación también está implicada la vía de Wnt. Los receptores Fz y Ryk, que se expresan de manera diferencial en las CGR, son responsables de la generación del mapa retinotópico en el CS. Estos receptores median una señal de atracción la cual implica a Fz y otra de repulsión que implica a Ryk, frente a Wnt3a secretado por las células del CS (Fig. 3) (Luo, 2006; Schmitt et al., 2006). Además los mutantes de pez cebra en la

proteína APC1 también presentan defectos en la proyección al tectum como ocurría a nivel de QO (Paridaen et al., 2009).

La fasciculación es un mecanismo esencial en la guía axonal durante la extensión de los axones a lo largo de la vía visual, pero dichos axones deben desfascicularse para poder proyectar a sus diferentes dianas. Los mecanismos de desfasciculación no están claros en la actualidad. Las metaloproteasas han emergido como un mecanismo de modulación de la adhesión celular. Metaloproteasas como las ADAMs han sido implicadas en el corte de moléculas de adhesión como N-caderina o L1, las cuales participan en la fasciculación de los axones en la vía visual. Así, la regulación de la actividad espacio-temporal de ADAM podría coordinar el desarrollo de las proyecciones visuales, como se ha visto mediante el uso de inhibidores de metaloproteasas en *Xenopus* (Webber et al., 2002). Recientes estudios de nuestro laboratorio, muestran un papel de los SFRPs en la modulación de la actividad de la metaloproteasa ADAM10.

Estas moléculas son proteína secretables que se han relacionado a la vía de señalización de Wnt.

1.7 Señalización de Wnt

Los Wnts son una familia génica que codifica glicoproteínas secretables palmitoiladas. Estas proteínas son homólogas a Wingless de *Drosophila*, y activan una vía compleja, que tradicionalmente ha sido dividida en tres ramas que interactúan entre ellas: la vía canónica de Wnt/ β -catenina, la vía PCP (Planar Cell Polarity), y la vía de Wnt- Ca^{2+} (Bovolenta et al., 2006; Logan and Nusse, 2004).

La activación de la vía canónica de Wnt conlleva la translocación al núcleo de β -catenina que, junto con co-factores de la familia Tcf/Lef, activará la transcripción de genes diana de la propia vía (Fig. 6A) (Logan and Nusse, 2004). La vía de PCP se determina por activar mediante una cascada de señalización intracelular a las GTPasas Rho y Rac, que activan a las quinasas ROCK y JNK respectivamente, y que acaban por modular la dinámica del citoesqueleto de actina de la célula. Por otro lado, la activación de la vía de Wnt/ Ca^{2+} se caracteriza por provocar una acumulación de calcio en el citoplasma, lo que activa a la Calcineurina (Calc), la Ca^{2+} /Calmodulina quinasa II (CAMKII), la Proteína Kinasa C (PKC) y al factor nuclear de activación de células T (NF-AT) (Fig. 6B) (Logan and Nusse, 2004).

Los Wnt, al igual que los Hh, sufren una serie de modificaciones postraduccionales que les confieren una actividad biológica específica. El morfógeno

Introducción

presenta varios procesos de glicosilación y palmitoilación antes de ser secretado. Por ejemplo, el grupo palmitilo de Wnt posibilita su unión con el complejo formado por Eveness Interrupted (Evi) y Wntless (Wls), y su posterior liberación desde la membrana plasmática (Banziger et al., 2006; Bartscherer et al., 2006; Logan and Nusse, 2004). Una vez secretado, Wnt interactúa con diferentes glucosaminoglicanos de la matriz extracelular, los cuales modulan su distribución, difusión y señalización (Logan and Nusse, 2004).

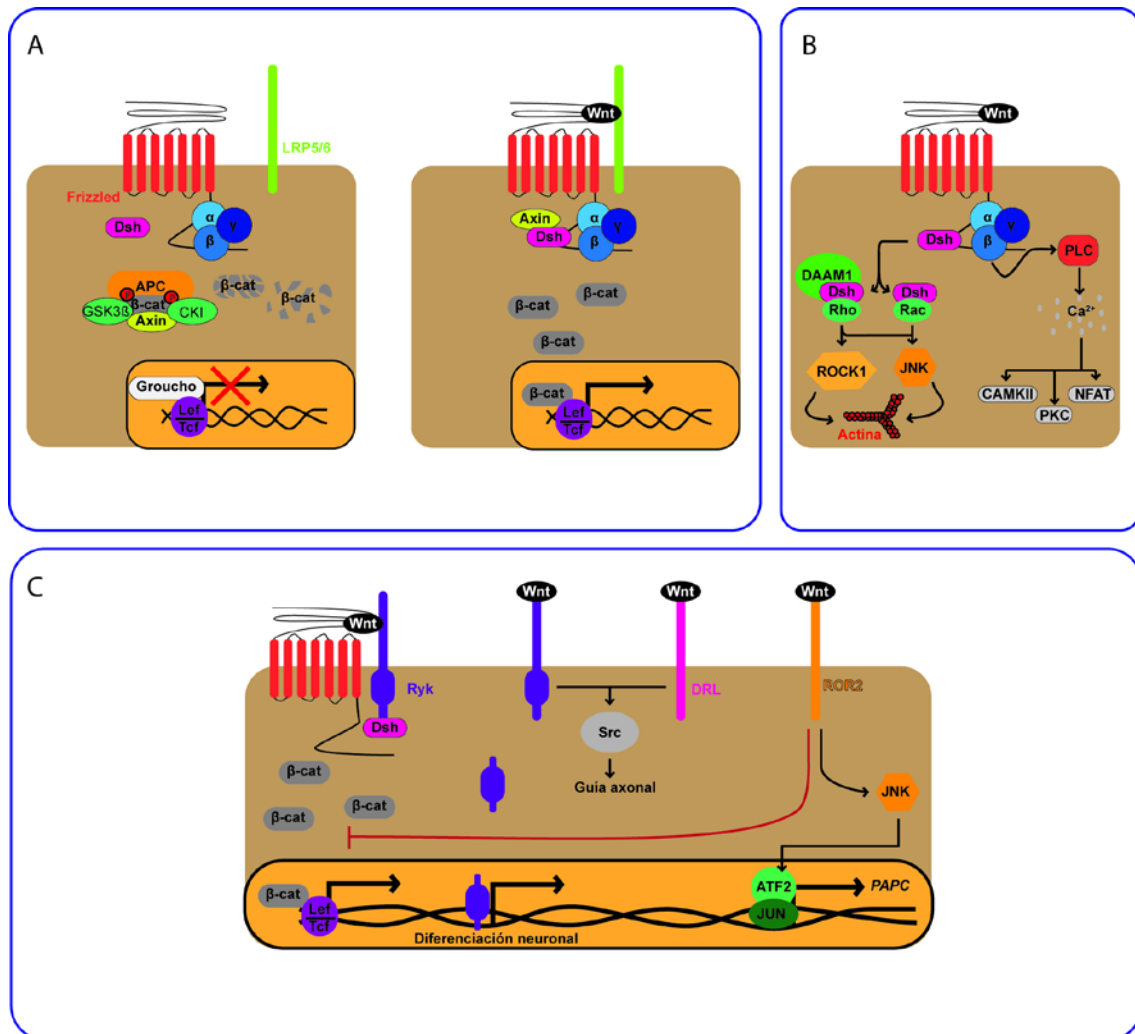


Figura 6. Esquema representativo de la vía de señalización de Wnt.

Los Wnt pueden desencadenar diversas cascadas de señalización intracelular, que además pueden interaccionar conjuntamente. **A)** La ruta de Wnt/β-catenina que se caracteriza por la acumulación de la β-catenina cuando el ligando Wnt está presente. β-catenina se introduce en el núcleo y activa la expresión de genes diana (derecha). **B)** La ruta de la polaridad planar implicada en la remodelación del citoesqueleto (izquierda), y la ruta de Wnt/Ca²⁺ implicada en un aumento del calcio intracelular, el cual dispara múltiples procesos (derecha). **C)** Esquema de otros receptores de Wnt y los diferentes procesos que desencadenan.

La familia de receptores Fz abarca, en humanos, 10 miembros. En general, se caracterizan por ser GPCRs de 7 dominios transmembrana. (Logan and Nusse, 2004). Constan de un dominio extracelular CRD (cysteine rich domain) rico en

cisteínas y un dominio intracelular para el acoplamiento de proteínas G heterotriméricas. Además, Fz interacciona con las proteínas transmembrana LRP5/6, relacionadas con receptores de lipoproteínas de baja densidad, formando un heterocomplejo que funciona como co-receptor para los Wnt (Fig. 6A). Por otra parte, Fz puede interaccionar de igual manera con otro receptor de los Wnt denominado Ryk (receptor-like tyrosine kinase), formando un heterocomplejo que une al ligando Wnt (Fig. 6C). El receptor huérfano tirosina kinasa (Ror) presenta al igual que Fz un dominio rico en cisteína capaz de unir a Wnt en la vía no canónica (Fig. 6C) (Bovolenta et al., 2006; Logan and Nusse, 2004).

La señalización de Wnt se controla por medio de diferentes antagonistas como son el factor inhibitorio de Wnt 1 (WIF1), Cerberus, Sclerostin, Dickkopf y las proteínas secretables relacionadas con Frizzled (SFRPs). Estas moléculas pueden inhibir la señalización de Wnt mediante la unión y secuestro de los correceptores LRP5/6 como es el caso de Dickkopf, o por la unión directa al ligando como es el caso de WIF1, Sclerostin o SFRP (Bovolenta et al., 2008; Kawano and Kypta, 2003; Li et al., 2005b; Logan and Nusse, 2004).

Los SFRPs no solo están implicados en la modulación de la señalización de Wnt, si no que pueden estar implicados en los procesos de regulación de la actividad de metaloproteasas como ADAM10. La cual ha sido implicada en el procesamiento de moléculas de adhesión que son claves en la fasciculación de los axones.

1.8 Secreted Frizzled-Related Proteins (SFRPs)

Los SFRPs constituyen una familia de moduladores de la señalización de Wnt. FrzB/SFRP3 fue el primer miembro de la familia de los SFRPs en ser descubierto gracias a la similitud de su secuencia con la del receptor Fz (Hoang et al., 1996; Rattner et al., 1997). La familia de los SFRPs consta de cinco miembros en mamíferos (Bovolenta et al., 2008).

La subfamilia de Sfrp1, Sfrp2 y Sfrp5, presentan una estructura modular con dos dominios a parte de un péptido señal para la secreción. El péptido señal es seguido de un dominio CRD, que se caracteriza por la presencia de 10 cisteínas altamente conservadas que forman puentes disulfuro generando una estructura similar a los dominios CRD de Fz o Ror (Bovolenta et al., 2008).

El dominio C-terminal se caracteriza por ser un segmento rico en residuos cargados positivamente, lo cual posibilita la unión de heparina. Además presenta seis residuos de cisteínas que generan otros tres puentes disulfuro. Esta estructura define

Introducción

en Sfrp1, Sfrp2 y Sfrp5 el dominio NTR, el cual ha sido identificado en otras proteínas, como son la Netrina1, la proteína potenciadora de la procolágeno C-proteinasa de tipo I (PCOLCE), algunos miembros de las proteínas del complemento y en los inhibidores de metaloproteasas denominados TIMPs (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*) (Bovolenta et al., 2008).

La primera función descrita para los SFRPs fue su capacidad para bloquear la vía de Wnt mediante la unión del ligando a su dominio CRD. Así se describió que SFRP3 (Frzb) se une a Wnt1 impidiendo su unión al receptor Fz (Leyns et al., 1997; Lin et al., 1997). Aunque posteriormente se ha descubierto que no solo el dominio CRD puede unir al ligando Wnt, sino que, también el dominio NTR posee esta capacidad, definiéndose así una molécula con varios sitios de unión a Wnt (Fig7. B) (Bovolenta et al., 2008).

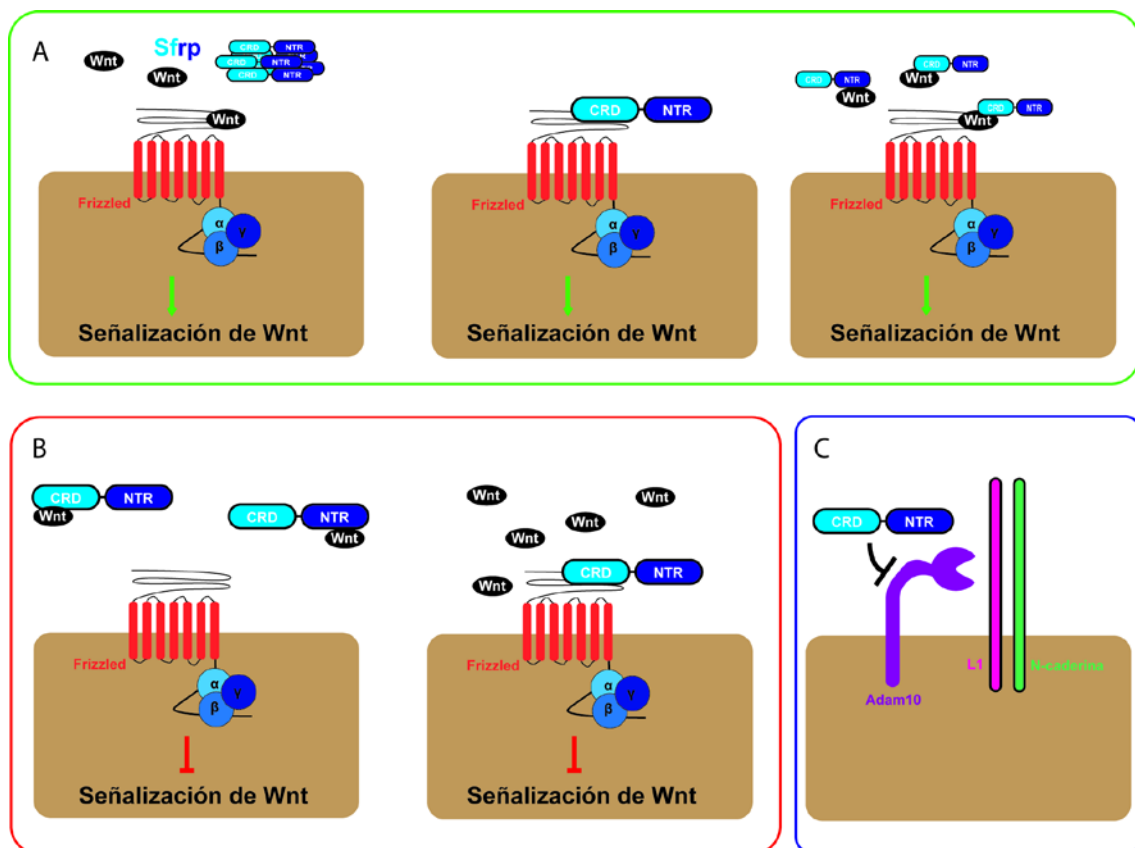


Figura 7. Esquema representativo de los SFRPs y sus diferentes funciones .

Estructura de SFRP, observándose su dominio CRD (azul oscuro) y el dominio NTR (azul claro). **A)** Función de SFRP en la modulación positiva de la vía de Wnt, mediante la formación de complejos que permiten la no unión a Wnt (izquierda), la activación del receptor Fz independientemente de Wnt (centro), o favoreciendo el gradiente del ligando (derecha). **B)** Función de SFRP en la inhibición de la vía de Wnt, mediante el secuestro del ligando (izquierda) o el impedimento de la unión de Wnt al receptor (derecha). **C)** Otras funciones de SFRP como es la modulación de la actividad de ADAM10, inhibiendo el corte de sus sustratos.

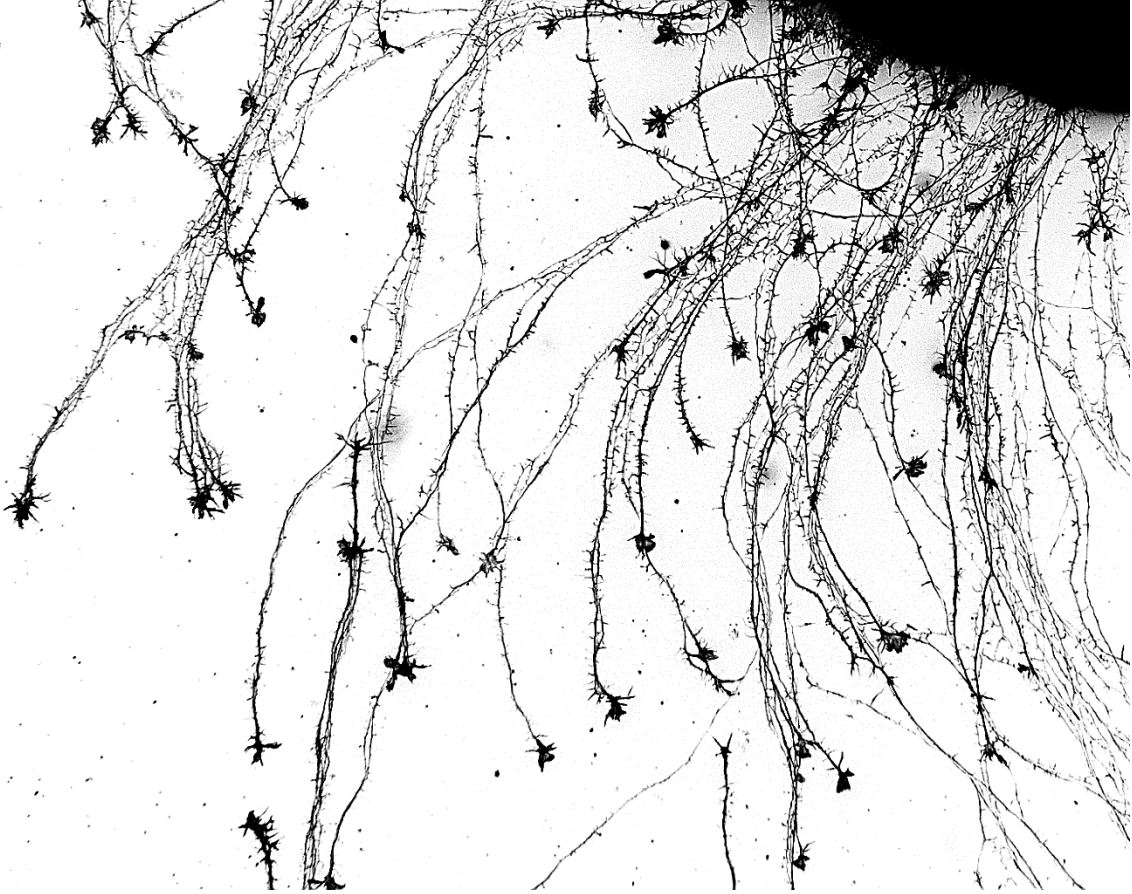
Los SFRPs regulan la vía de Wnt de una forma compleja, utilizando diversos mecanismos que modulan la vía positivamente o la inhiben. Además de la modulación negativa mediante el secuestro del ligando Wnt por la unión a su CRD o NTR, se ha visto que los SFRPs pueden interaccionar con Fz por sus dominios CRD, formándose un hetero-complejo que evita la unión del ligando a Fz, regulando así la vía de Wnt negativamente (Fig. 7B). Pueden favorecer la activación de la vía mediante la formación de complejos entre diversas moléculas de SFRPs, los cuales impiden la unión de las propias moléculas de SFRP a Wnt o Fz. Además, los SFRPs pueden modular la señalización positivamente mediante la formación de complejos Wnt-SFRP que favorecerán el transporte de Wnt, potenciándose así la señalización (Fig. 7A) (Bovolenta et al., 2008; Esteve et al., 2011b; Mii and Taira, 2009)

Las moléculas SFRPs no sólo modulan la señalización de Wnt mediante el impedimento o el favorecimiento de la unión de Wnt al receptor Fz, sino que están implicadas en la activación de la vía, como se ha visto en la neuritogénesis de las CGR, en las cuales el CRD de SFRP1 promueve el crecimiento de las neuritas de manera independiente de los Wnt, en un proceso en el cual está implicado el receptor Fz2 (Fig. 7A) (Rodriguez et al., 2005).

La mayoría de las funciones de los SFRPs han sido relacionadas con la vía de los Wnt, pero se ha visto que pueden interaccionar con otras moléculas que no pertenecen a la ruta de señalización de los Wnt como fibronectina, el ligando del receptor del factor de activación nuclear Kappa B (RANKL) y BMP/Tolloid (Bovolenta et al., 2008). Como se ha dicho anteriormente SFRP puede inhibir a ADAM10, una metaloproteasa implicada en el corte de múltiples substratos entre los que se encuentran Notch, el precursor de la proteína amiloide (APP) o las moléculas de adhesión N-caderina y L1 (Esteve et al., 2011a) (Fig. 7C).

Sfrp1 y Sfrp2 se expresan durante el desarrollo del ojo, donde controlan la neurogénesis de la retina regulando la señalización de Notch. En base a su localización y a estudios por parte del laboratorio (Rodriguez et al., 2005), los Sfrps podrían tener también un papel en el crecimiento de los axones de las CGR.

Objetivos



2.1 Capítulo I: Papel de Boc en la especificación de las CGR en la región VT de la retina.

Las CGR expresan Shh durante su proceso de diferenciación. Shh es necesario para la proliferación y diferenciación de la retina (Wang et al., 2005; Zhang and Yang, 2001a). Datos previos de nuestro grupo muestran que el receptor de Shh, Boc, se expresa en la región VT de la retina. Este receptor se expresa en las CGRi, caracterizadas por la expresión de Zic2 y la ausencia de la expresión de Shh e Islet2 (Pak et al., 2004; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Se desconoce cuál es el papel de la señalización de Shh en la especificación y diferenciación de las CGRi. Pero, se sabe que en otras regiones del SNC, como es el desarrollo del prosencéfalo en el pez cebra, Zic2 y la señalización de Shh presentan un bucle de regulación (Sanek et al., 2009). Estos datos, junto con la función de Boc en la modulación de la señalización de Shh en el SNC de pez cebra (Bergeron et al., 2011), indican que Boc podría modular la señalización de Shh en las CGRi.

Datos de nuestro laboratorio han demostrado que Shh secretado por las CGR es necesario para la guía de sus axones a través del sistema visual proximal (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Boc, ha sido implicado como receptor de Shh en la guía de las neuronas comisurales de la médula espinal (Okada et al., 2006). Datos de nuestro laboratorio indican que, *in vitro*, las neuritas de los explantes de la ZVT presentan un comportamiento ante Shh diferente al del resto de la retina. Boc podría tener un papel en la guía de los axones de las CGRi, como ha sido propuesto por Fabre et al. (2010).

Por ello, en esta tesis, hemos querido analizar:

- El papel de Boc en la especificación de las CGRi mediante la modulación de la señalización de Shh.
- El papel de Boc en la guía de los axones de las CGRi a lo largo de la vía visual.
- La existencia de un posible bucle de regulación entre la señalización de Shh y Zic2 en la región VT de la retina.

Objetivos

2.2 Capítulo II: Papel de Sfrp1/2 en la guía de los axones de las CGR.

Los axones de las CGR son guiados a través de la vía visual mediante diferentes tipos de moléculas de guía axonal, como son Slits, semaforinas, efrinas, Shh o Wnt (Erskine and Herrera, 2014). Durante su extensión, los axones deben coordinar procesos de fasciculación/desfasciculación para una correcta proyección a los núcleos del cerebro (Bao, 2008).

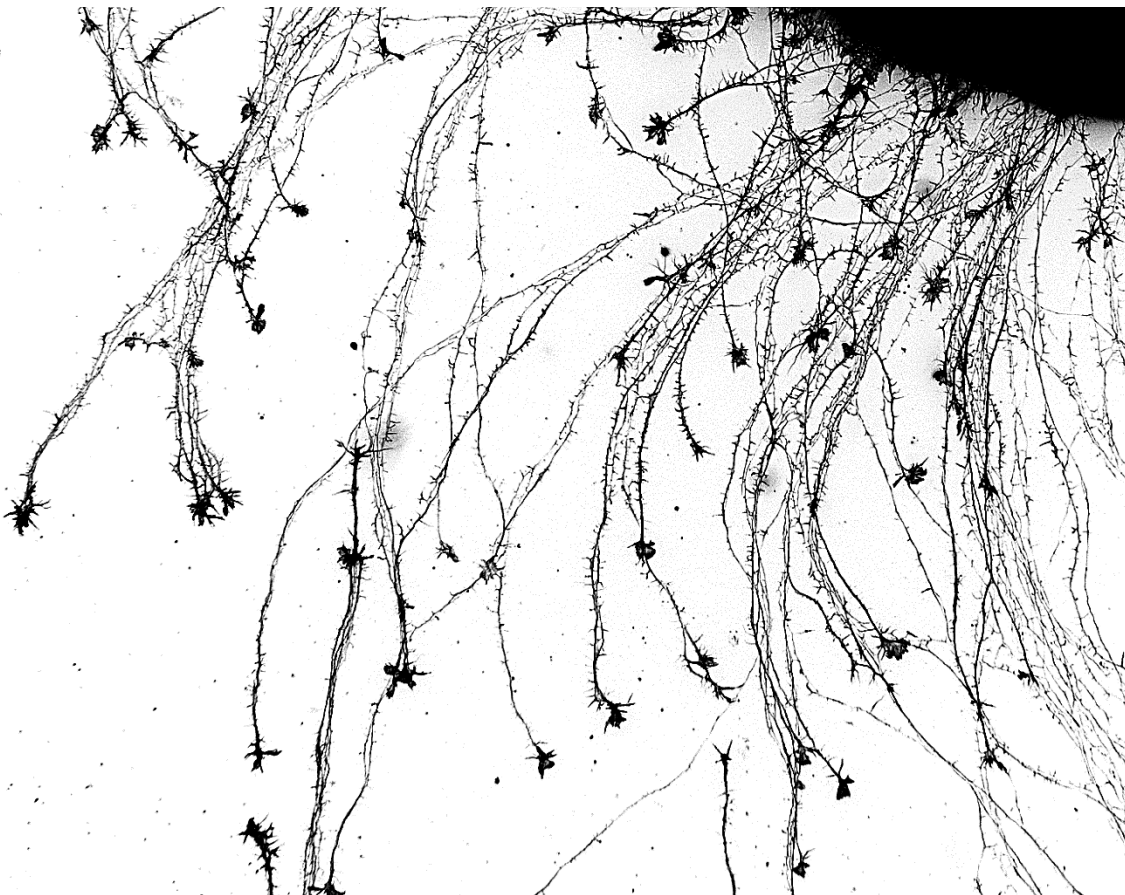
Estudios recientes han demostrado que la actividad de metaloproteasas de la familia de las ADAMs, más concretamente ADAM10, son capaces de regular la señalización de las moléculas de guía axonal, mediante el procesamiento de distintas moléculas (Bai and Pfaff, 2011; McFarlane, 2003).

Trabajos de nuestro laboratorio han mostrado que Sfrp1 y Sfrp2 se expresan en la retina de ratón durante su desarrollo, controlando la neurogénesis mediante la regulación de la vía de Notch. Dicha regulación es mediada por la modulación de ADAM10 (Esteve et al., 2011a). Sin embargo, la localización de Sfrp1/2 y su papel en la reorientación del cono de crecimiento de las CGR (Rodríguez et al., 2005), indican que los Sfrps podría tener un papel en el crecimiento de los axones de las CGR.

Por tanto nos planteamos estudiar:

- El posible papel de Sfrp1/2 en la guía de los axones de las CGR en ratón.
- La posible regulación de la actividad de ADAM10 por los Sfrps durante la guía de los axones de las CGR.

Materiales y Métodos



3.1 Animales de experimentación.

Para la realización de esta tesis se usaron embriones de ratón y animales adultos de ambos sexos. Los animales fueron manipulados siguiendo la regulación española (RD223/88) y europea (86/609/ECC). El estudio se realizó con animales homocigotos o heterocigotos del mismo estadio del desarrollo, comparándose siempre entre animales de la misma camada o con animales *wild type* (wt) de la misma edad. La fecha de observación del tapón vaginal fue considerada como E0.5.

Los ratones *Boc*^{-/-} fueron generados y mantenidos como describen (Okada et al., 2006). Los embriones *Zic2*^{kd/kd}, *FoxD1*^{-/-} y sus controles fueron cedidos por la Dra. E. Herrera.

Los ratones *Boc*^{-/-} fueron mantenidos en fondos genéticos CD1 y C57BL6. Aunque, las cepas de ratones albinos presentan un número de células *Zic2* positivas en la región VT ligeramente menor que el fondo genético C57BL (Rebsam et al., 2012), no parecen ser cambios significativos, pudiéndose realizar el análisis conjunto de los dos fondos genéticos.

Los ratones nulos *Sfrp1*^{-/-} o *Sfrp2*^{-/-}, el doble nulo *Sfrp1*^{-/-};*sfrp2*^{-/-} y sus controles *wild type* se obtuvieron a partir de los ratones *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{+/-} mediante cruces y retro-cruces con fondo genético C57BL/6J como se describe en (Esteve et al., 2011a; Satoh et al., 2006). Remarcar que el doble mutante *Sfrp1*^{-/-};*sfrp2*^{-/-} no sobrevive más allá del estadio E16.5, limitando este hecho su análisis (Esteve et al., 2011a; Satoh et al., 2006).

3.2 Plásmidos.

Para la electroporación se usó el vector de expresión pCAGGS (Garcia-Frigola et al., 2007), en el que fueron subclonados las secuencias codificantes de los genes de ratón *FoxD1* (Carreres et al., 2011), *Shh::GFP* (subclonado desde el pCDNA3-*Shh::GFP* cedido por el Dr. A. P. McMahon (Chamberlain et al., 2008)), *Boc::GFP* (subclonado desde el pEGFPN1-*Boc::GFP* cedido por la Dra. A. Okada) y el gen humano *ZIC2* (Garcia-Frigola et al., 2008). La secuencia codificante del gen de ratón *Boc*, fue amplificada por PCR desde ADN copia extraído de cerebro de embrión de ratón en estadio E13.5 (*Forward*: 5'CACTGTACCTCGTGGGAAGA3'; *Reverse*: 5'GGGATATTAGCTTCGGGCCTA3') e introducida en el vector pSC-A mediante el *StrataClone PCR Cloning Kit* (Agilent Technologies), posteriormente fue subclonada en el vector pCAGGS para su uso en electroporación. La sobreexpresión de ADAM10 se realizó mediante la electroporación del vector pRK5M-*ADAM10* (AddGene).

Materiales y Métodos

3.3 Hibridación in situ.

Los embriones en estadio E14.5 o más jóvenes fueron fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 01M pH7.2 durante 3 horas a temperatura ambiente en rotación. Embriones en estadios más avanzados fueron perfundidos cardiacamente y postfijados en la misma solución durante 2 horas. El tejido fue lavado con tampón fosfato (PBS) en ambos casos.

El tejido fue crio-preservado mediante la inmersión en sacarosa al 30% durante toda la noche. Posteriormente se embebió en una solución de gelatina/sacarosa y fue congelado con isopentano y almacenado a -80°C. Los bloques con tejido fueron cortados en series frontales usando un criostato (Leica). La técnica de hibridación *in situ* fue realizada como se describe en (Esteve et al., 2003) con las siguientes sondas específicas marcadas con dioxigenina: *Shh*, *Zic2*, *Islet2*, *Sert*, *Boc*, *Sfrp1*, *Sfrp2*, *Netrina*, *EphB2*, *Adam10* y los heterologos de rata *Slit1*, *Slit2* y *Robo2*.

3.4 Inmunofluorescencia / inmunohistoquímica.

Las secciones de criostato fueron permeabilizadas con PBS conteniendo tritón X-100 al 0,1% (PBT). Posteriormente, las secciones permeabilizadas fueron tratadas con un tampón de bloqueo que contenía albumina de suero bovina al 1% en PBT. Finalmente, se incubaron los anticuerpos primarios en la solución de bloqueo durante toda la noche.

Los anticuerpos primarios usados durante esta tesis fueron:

- Anti-Zic2 hecho en conejo (1:5000; Millipore).
- Anti-Cdon hecho en cabra (1:100; R&D Systems).
- Anti-GFP hecho en conejo (1:1000; Invitrogen).
- Anti-Brn3b hecho en cabra (1:500; Santa Cruz Biotechnology).
- Anti-Islet2 hecho en cobaya (1:8000; cedido por el Profesor T. Jessell).
- Anti-Phospo Histona H3 (PH3) hecho en conejo (1:2000; Cell Signaling Technology).
- Anti-Sfrp1 hecho en conejo (1:500; Abcam).
- Anti-Sfrp2 hecho en rata (1:500; cedido por S.Hauck)(Hauck et al., 2012).
- Anti- β III tubulina (Tuj1) hecho en ratón (1:1000; Promega).
- Anti-Neurofilamento M hecho en conejo (1:500; Millipore).
- Anti-Robo2 hecho en cabra (1:500; cedido por el Profesor Murakami)(Tamada et al., 2008).

- Anti-L1-Cam hecho en conejo (1:500;(Lemmon et al., 1989)).
- Anti-N-caderina hecho en ratón (1:500; Invitrogen).

El desenmascaramiento de antígenos mediante calor se usó para algunas de las inmunohistoquímicas, como en las que se usaron los anticuerpos primarios anti-Cdon, anti-Zic2, anti-Brn3b y anti-PH3. El tratamiento mediante calor se hizo sumergiendo las secciones en tampón citrato 10mM a pH6 e hirviéndolas en una olla a presión (BIOCAREMEDICAL) durante 30 segundos a 110°C.

En las inmunohistoquímicas reveladas con Di-Amino Bencidina (DAB) se trataron las secciones con agua oxigenada al 3% en metanol 90% durante 10 minutos, antes de la permeabilización, y si procede después del hervido, para eliminar la actividad de la peroxidasa endógena de los tejidos.

Las secciones después de la incubación con el anticuerpo primario fueron lavadas con PBS e incubadas con anticuerpos secundarios acoplados a fluorocromos Alexa-488, Alexa-555, Alexa-594, Alexa-647 (Molecular Probes, Invitrogene) o conjugados con Biotina (Jackson Lab). Para la detección de anticuerpos secundarios acoplados a Biotina se usó Estreptavidina-POD, usando una incubación con DAB posterior. Las secciones fueron incubadas con DAPI (1µg/ml, Vector) para la observación de los núcleos.

La señal de la inmunofluorescencia de Sfrp2 fue amplificada mediante tiramida siguiendo el protocolo sugerido por el comerciante (PerkinElmer).

3.5 Reacción de la β -galactosidasa.

El análisis de la expresión de Boc, mediante la actividad de la β -galactosidasa, en el mutante *Boc^{+/-}* se realizó en embriones E14.5. Las secciones frontales se incubaron a 37°C toda la noche en X-Gal 1mg/ml (Invitrogen) disuelto en tampón de revelado (ferrocianuro potásico 5mM, ferricianuro potásico 5mM, deoxicolato sódico 0,01%, MgCl₂ 2mM y tween 0,05 en PBS).

3.6 Trazados anterógrados/retrógrados.

El trazado de los axones de las CGR se realizó usando una solución de 1,1'-Diocadecyl-3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI, D282, Molecular Probes) o 3,3'-diocadeciloxacarbocianina (DiO, D275, Molecular Probes) disueltos en una solución 4:10% en dimetilformamida/sacarosa; también se usaron cristales de DiI o DiO.

Materiales y Métodos

Los trazados intra-retinianos se realizaron mediante la inyección de la solución de Dil y DiO en la periferia de retinas de embriones en estadio E15.5 que previamente habían sido extraídas y fijadas con PFA 4%. Las retinas fueron incubadas en PBS a 37°C durante 1 hora.

Los trazados anterógrados unilaterales se realizaron mediante la extracción de la lente de un ojo a los embriones, colocando en el disco óptico un cristal de Dil y cubriéndolo de nuevo con la lente. Las cabezas de los embriones se incubaron en PBS con trazas de PFA 0,4% a 37°C durante al menos 2 semanas. Los cerebros trazados fueron diseccionados, exponiéndose el quiasma óptico. Para el análisis de la proyección al NGL se eliminaron las vesículas telencefálicas dejando expuesto el tracto óptico. Los trazados fueron analizados y fotografiados en una lupa de fluorescencia (Leica). Algunos cerebros fueron embebidos en agarosa 4% y cortados en secciones frontales de 100µm de grosor en un vibratomo (Leica), estas secciones se analizaron mediante un microscopio de fluorescencia (Leica).

Los trazados retrógrados de Dil se realizaron mediante la colocación de un pequeño cristal de Dil en el segmento inicial del tracto óptico. Los embriones en estadio E15.5 fueron fijados en PFA 4% como se ha descrito anteriormente; se diseccionó la cabeza desde la parte ventral, dejando el quiasma óptico al descubierto y se colocó un cristal de Dil en el inicio del tracto óptico. Se dejó que el Dil difundiese durante 2 semanas. Posteriormente se extrajeron los ojos y se embebieron en agarosa 4% para hacer secciones de 50µm de grosor al vibratomo (Leica).

Los trazados anterogrados con toxina colérica se realizaron mediante la inyección de la subunidad B de la toxina colérica conjugada con un fluorocromo Alexa-488 (en el ojo derecho) o Alexa-555 (en el ojo izquierdo) (Invitrogen) en animales *Boc*^{-/-} y *Boc*^{+/-} desde P12 a P30 anestesiados con isoflurano (Isova Vet). Transcurridas 48h, los animales fueron anestesiados y perfundidos con PFA 4%, posteriormente se extrajeron los cerebros. Los cerebros fueron embebidos en agarosa 4% y cortados en secciones frontales u horizontales de 50µm de grosor en el vibratomo (Leica) para su posterior análisis mediante microscopía confocal.

Los trazados retrogrados con Dextrano-Rodaminado (3000MW, Invitrogen), se realizaron en embriones E17.5 como se describe en (Herrera et al., 2003) . Las cabezas fueron diseccionadas desde la parte ventral y se colocó el Dextrano-rodaminado rompiendo el segmento inicial del tracto óptico, se incubó el tejido a 37°C en líquido cerebroespinal artificial burbujeado con carbógeno durante toda la noche, posteriormente se fijó el tejido durante 2 horas en PFA 4%.

3.7 Electroporación *in utero* / *ex utero*.

La electroporación *in utero* se realizó en embriones E13.5 wt. Las hembras gestantes fueron anestesiadas con isoflurano (como se describió anteriormente), se expuso el útero birrámeo y se inyectaron a través de la pared uterina diferentes soluciones de ADN a 2µg/µl (pCAG-*GFP* solo o combinado con pCAG-*Boc*, pCAG-*ZIC2* o pCAG-*FoxD1* y pCAG-*Boc::GFP* o pCAG-*Shh::GFP* solos), inyectándose un ojo por embrión antes de la electroporación (Nieto-Lopez and Sanchez-Arrones, 2014). Los embriones se dejaron desarrollar hasta el estadio E18.5, posteriormente se extrajeron los embriones y se fijaron en PFA 4%. Las retinas fueron extraídas y montadas en plano para su análisis en el microscopio de fluorescencia. Los cerebros fueron extraídos y la trayectoria de las CGR electroporadas fueron analizadas bajo la lupa de fluorescencia (Leica); posteriormente los cerebros fueron embebidos en agarosa 4% o en gelatina/sacarosa para hacer secciones frontales u horizontales en el vibratomo o el criostato respectivamente.

La electroporación *ex utero* se realizó en embriones E13.5 o E15.5 *wild type*. Las diferentes soluciones de ADN a 2µg/µl (pCAG-*GFP* sola o combinada con pCAG-*Boc* o pRK5M-*ADAM10*) fueron inyectados en ambos ojos del embrión antes de ser electroporados. Las retinas fueron extraídas e incubadas, en placas de cultivo (Nunc) con DEMEM/F12 (Invitrogen) y suplementadas con N-2 al 1% (Invitrogen), a 37°C durante toda la noche. Posteriormente, las retinas fueron diseccionadas bajo una lupa de fluorescencia (Leica) para seleccionar solo la retina central electroporada. El tejido electroporado se usó para experimentos de explantes o de qRT-PCR (*quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction*).

3.8 Cultivo de explantes.

Explantes de embriones a estadio E15.5 *wild type*, *Sfrp2*^{-/-} o *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} de retina central fueron crecidos en cubreobjetos de cristal (14mm de diámetro) cubiertos con poli-D-Lisina (10µg/ml, Invitrogen) y laminina (10µg/ml, Invitrogen) en DEMEM/F12 suplementado con N2 (Gibco) a 37°C como se describe en (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Los explantes fueron crecidos en presencia o ausencia de *Sfrp1* (500ng/ml, Sigma) (Esteve et al., 2003) o con el inhibidor específico de ADAM10 GI254023X (Tocris). Pasadas 48 horas, los explantes fueron fijados a 37°C en PFA al 2%, conteniendo sacarosa al 11%. Posteriormente se detectaron los axones mediante una tinción con anti-βIII-tubulina.

Para determinar el papel de ADAM10 sobre la fasciculación de los axones de las CGR *in vitro*, embriones de ratón en estadio E13.5 (al menos 10 para cada

Materiales y Métodos

condición) fueron electroporados *ex utero* con una solución de ADN de 2µg/µl compuesta de una mezcla de pKR5M-ADAM10 (Addgene) y pCAG-GFP (5:1) o pCAG-GFP solo, como se ha descrito anteriormente. Las regiones GFP positivas fueron diseccionadas y se cultivaron como se ha descrito anteriormente. Pasadas 48 horas los explantes se fijaron y se visualizaron con anti-GFP y anti-βIII-tubulina.

3.9 qRT-PCR.

Embriones de ratón en estadio E13.5 *wild type* fueron electroporados *ex utero* como se ha descrito anteriormente. Después de 24 horas, las regiones GFP positivas de las retinas fueron diseccionadas y procesadas para qRT-PCR. El ARN total fue extraído y purificado siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). El ARN se retrotranscribió usando el kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems). La PCR cuantitativa se realizó usando el protocolo sugerido por el fabricante de *Power SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems) en reacciones de 25µl con una cantidad de ADN copia de 2µl. Los cebadores para la realización de la PCR cuantitativa fueron diseñados usando el programa *Primer Express* (Applied Biosystems, ver tabla1). Los cebadores, en todos los casos, amplificaban una región de un tamaño de entre 100 y 150 pares de bases. Los niveles de transcripción fueron normalizados al ARN de la subunidad 18S del ribosoma, sus niveles fueron comparados con los controles electroporados solo con pCAG-GFP. Los datos fueron analizados mediante el test de Mann-Whitney, considerándose significativo con $p < 0,05$.

Gen	Forward	Reverse
Boc	CGTGGTGTGTCCCTCTTGT	TGAGCCCAAAGTCCATAAGC
Shh	AAAGCTGACCCCTTTAGCCTA	TGAGTTCCTTAAATCGTTCCGAG
18S	AACCCGTTGAACCCCAT	CCATCCAATCGGTAGTAGCG

Tabla1. Cebadores usados para qRT-PCR

3.10 Western Blots.

Las retinas de embriones E16.5 junto con sus respectivos nervios y tractos ópticos fueron extraídos de animales *wild type*, *sfrp1^{-/-}*, *sfrp2^{-/-}* y *sfrp1^{-/-};sfrp2^{-/-}*. El tejido fue homogeneizado en tampón de lisis (150mM NaCl, Triton X-100 2%, Tris 50mM pH8) suplementado con una mezcla de inhibidores de proteasas (Roche) y PMSF. En el caso de los explantes de retina electroporados, el medio de cultivo fue retirado y se lavaron los explantes con PBS, posteriormente el tejido fue homogeneizado con tampón de lisis (150mM NaCl, Triton X-100 2%, Tris 50mM pH8,

CaCl₂ 10mM) suplementado también con inhibidores de proteasas. El contenido de proteínas de los extractos fue separado mediante electroforesis en geles de SDS poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, posteriormente se transfirieron las proteínas a una membrana de PVDF. Después del bloqueo en TBS/Tween 0,1%/leche en polvo 5%, las membranas fueron incubadas durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo policlonal de conejo 74-5H7 que reconoce la porción citoplasmática de L1 (1:500, cedido por el Dr. V. Lemmon (Lemmon et al., 1989)) o con el anticuerpo de ratón que reconoce el dominio C-terminal de la N-cadherina (1:500, Invitrogen), en ambos casos se realizó una incubación con anti- α -tubulina de ratón (1:10000, Sigma) usada como control de carga. Las membranas fueron incubadas con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa, seguido de una detección mediante *ECL Advanced Western Blotting Detection Kit* (Amersham). Las bandas inmunoreactivas fueron densitometradas y la cantidad del fragmento proteolizado fue calculado como la proporción fragmento/completa/ α -tubulina. Los western blot se repitieron al menos 3 veces obteniendo resultados similares.

Para determinar la especificidad del anticuerpo de Sfrp2, se extrajeron retinas de embriones *wild type* y *Sfrp2*^{-/-} como se describe anteriormente. Los lisados fueron incubados con bolitas acrílicas con heparina durante 1 hora, las bolitas fueron recuperadas por centrifugación. Las proteínas que se unen a heparina fueron resueltas en un gel de SDS acrilamida en condiciones desnaturalizantes y transferido a una membrana de PDVF. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-Sfrp2, y se procesó la membrana como se ha descrito anteriormente.

3.11 Análisis de imagen y estadístico

Los tejidos fueron analizados con una lupa M205FA o con un microscopio DM CTR5000, ambos equipados con una cámara monocroma DFC350Fx o una cámara a color DFC500 (Leica Microsystems). Los análisis de microscopía confocal fueron realizados con el microscopio confocal Leica TCS SP-5 y el Zeiss LSM510 META.

La comparación de la región VT del ratón *Boc*^{-/-} con la del ratón *wild type* se realizó usando secciones centrales tomadas a nivel del nervio óptico, tomándose secciones equivalentes en cada uno de los estadios analizados. El límite de la región VT fue definida para cada caso usando la región *Zic2* positiva sobre secciones seriadas de embriones *wild type*, usándose esa delimitación sobre embriones *Boc*^{-/-}. El número de células positivas en la región VT de *Zic2*, *Islet2*, *Brn3b* fue determinado contando los núcleos de cuatro secciones centrales de ambos ojos para cada uno de

Materiales y Métodos

los embriones analizados, analizándose un mínimo de cinco embriones para cada caso.

El índice de ipsilateralidad fue calculado como se describe en (Erskine et al., 2011), dividiéndose la intensidad de fluorescencia del tracto óptico ipsilateral del ojo trazado/electroporado entre la suma de las intensidades de ambos tractos.

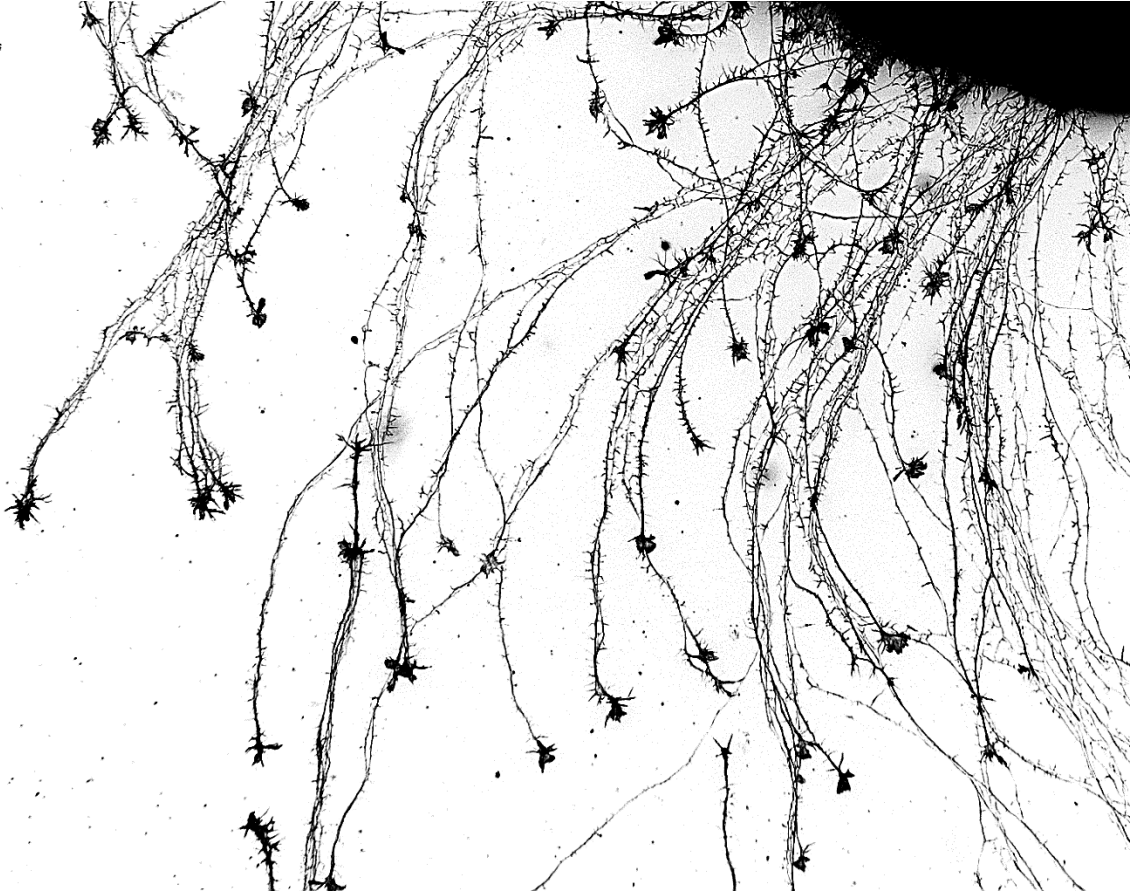
La distribución de los píxeles rojos y verdes en el núcleo geniculado lateral dorsal fue determinada con microscopía confocal usando un Leica TCS SP-5, tomando imágenes comparables en el mismo eje anteroposterior.

La cuantificación de la fasciculación de los explantes de retina se realizó mediante el análisis de diez explantes por condición como mínimo, tomándose de cada explantes tres fotografías de diferentes regiones a alto aumento (60X con un zoom de 1,5), estando tomadas las fotos del crecimiento de las neuritas a la misma distancia del borde formado por el cuerpo del explante. En el análisis de las imágenes se trazó una línea perpendicular al crecimiento de los explantes, obteniéndose los valores de grises que cortaban con dicha línea. El ancho de los fascículos se determinó como los puntos consecutivos que tenían un valor de grises superior a 25 (valores inferiores a 25 fueron determinados como fondo). El grado de la fasciculación de los axones fue determinado como el porcentaje de fascículos con anchuras comprendidas entre un determinado rango de píxeles. En el caso de la sobreexpresión de ADAM10, el grado de fasciculación fue evaluado como porcentaje de fascículos GFP positivos.

La cuantificación del análisis de fluorescencia fue realizada mediante el programa Image J (National Institute of Health).

El análisis estadístico de la diferencia entre las medias se realizó mediante el test de la t de Student y el test de Bonferroni. También se usó el análisis de Mann-Whitney para el análisis de las qRT-PCR. En todos los casos se consideraron las siguientes significancias: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Resultados



Capítulo I



Papel de Boc en la especificación de las CGR en la región VT de la retina.

4.1.1 La proyección ipsilateral está reducida en ausencia de Boc.

Boc es una glicoproteína con dominios inmunoglobulina y fibronectina. Tanto Boc como su parólogo Cdon, y sus ortólogos en *Drosophila* Boi e Ihog, unen Shh y pueden interactuar con el receptor Ptch, funcionando como correceptores en la señalización de Hh (Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011; Tenzen et al., 2006). Boc presenta una función en guía axonal (Connor et al., 2005; Okada et al., 2006), su ausencia provoca un fallo en la guía de los axones de las neuronas comisurales en la medula espinal. En la vía visual, *Boc* se expresa en la región VT de la retina, más precisamente en las CGR que van a proyectar ipsilateralmente, coincidiendo su expresión con *Zic2* (Fabre et al., 2010). Shh se expresa en la región preóptica y en las propias CGRc (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Trousse et al., 2001). Esta distribución, junto con los experimentos funcionales y la reducción de la proyección ipsilateral observada en los embriones *Boc*^{-/-}, indican una posible función de Boc y la señalización de Shh en la determinación de la lateralidad de los axones de las CGR (Fabre et al., 2010), mecanismo que funcionaría en paralelo a la señalización EphB1/EfrinaB2 (Williams et al., 2003).

Mediante el trazado unilateral con cristales de Dil de la vía visual realizado por la Dra. Sánchez-Arrones, hemos confirmado que, en ausencia de Boc, se observa una reducción en la proyección ipsilateral en los embriones (Fig. 8A,B,I) y que esta reducción es más acusada en estadios postnatales, tanto a nivel de tracto como a nivel de NGL (Fig. 8C-F',I). Cabe destacar que la innervación a nivel de NGL de los ratones *Boc*^{-/-} es menos abundante que lo observado a nivel de tracto óptico, sugiriendo un crecimiento más lento de los axones mutantes. En este sentido, observamos una inusual acumulación de conos de crecimiento a nivel de quiasma en los ratones *Boc*^{-/-} (Fig. 8G, H). Comparado con los wt, los ratones *Boc*^{-/-} presentan una reducción en el tracto óptico de un 40-45% en el índice de ipsilateralidad (Fig. 8I), método semicuantitativo que compara la intensidad de la fluorescencia del TO ipsilateral frente a la suma de las intensidades de los dos tractos (Erskine et al., 2011).

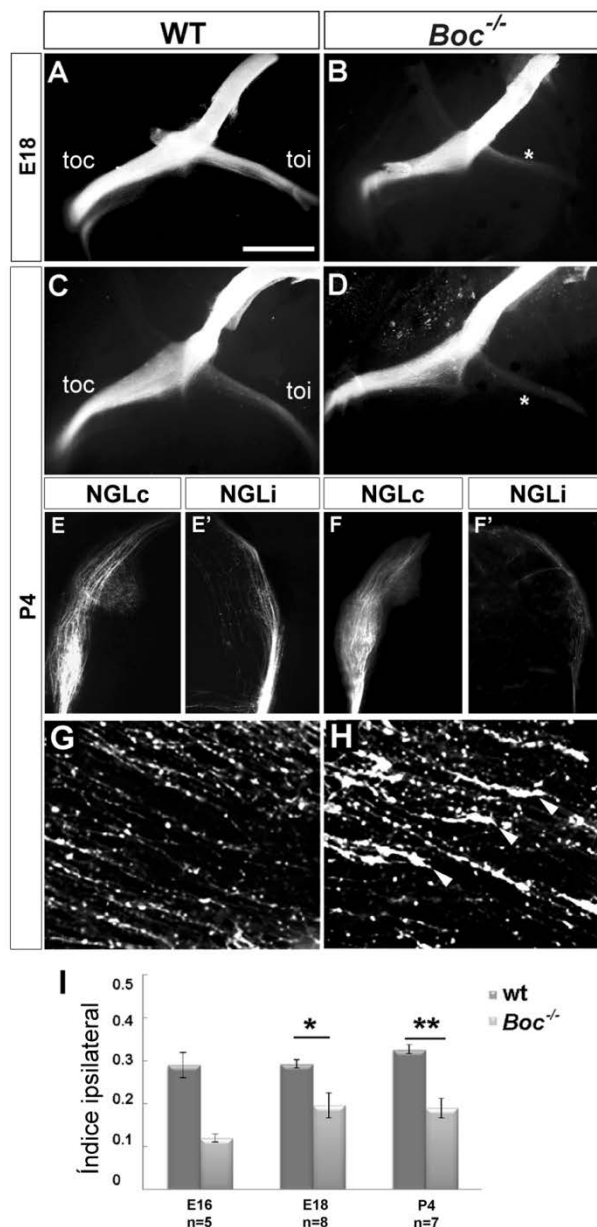


Figura 8. Los ratones *Boc*^{-/-} presentan una reducción en la proyección ipsilateral.

Visión ventral del QO *in toto* (A-D) y secciones frontales del NGL (E-F') u horizontales del QO (G,H) de ratones wt y *Boc*^{-/-} en estadio E18.5 y P4. Los animales fueron trazados unilateralmente en el DO con un cristal de Dil para visualizar la trayectoria de las fibras. A-F') Los ratones *Boc*^{-/-} presentan una reducción de la proyección ipsilateral en el TO marcada con asterisco (B,D) y en el NGL ipsilateral (F'). G,H) Los ratones *Boc*^{-/-} presentan un aumento de conos de crecimiento al inicio del TO ipsilateral, las cabezas de flechas indican los conos de crecimiento (H). I) Gráfico comparativo del índice ipsilateral entre los animales wt y los *Boc*^{-/-}, *p<0.05, **p<0.01 (test de t-student). Barra de escala 1000µm (A-D), 500µ (E-F'). Imágenes cortesía de la Dra. Sánchez-Arrones

4.1.2 Boc actúa por debajo de Zic2 pero no es suficiente para activar el programa ipsilateral

Boc se expresa en la región VT de la retina y colocaliza en las células Zic2 positivas del margen ciliar (Fig. 9A-C) y las CGR-i (Fabre et al., 2010; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). La reducción de la proyección ipsilateral en el mutante de *Boc*^{-/-}, junto con su colocalización con Zic2, sugiere que Boc podría estar actuando bajo el control de Zic2, como ocurre con EphB1 (Garcia-Frigola et al., 2008). Para corroborar esta posibilidad analizamos la expresión de *Boc* en el mutante hipomorfo de *Zic2* (*Zic2*^{kd/kd}) y en el mutante de *FoxD1*, ya que, se ha descrito que FoxD1 en la retina de ratón confiere la identidad ipsilateral actuando previamente a Zic2 (Carreres et al., 2011). En efecto, *Boc* no se expresa en la región VT de *Zic2*^{kd/kd}

(Fig. 9E) ni en el mutante de *FoxD1*, aunque sigue expresándose en el margen ciliar, donde también se expresa *Cdon* (Fig. 9D, F). Estos datos sugieren que la expresión de *Boc* está bajo el control de *Zic2* y/o *FoxD1*.

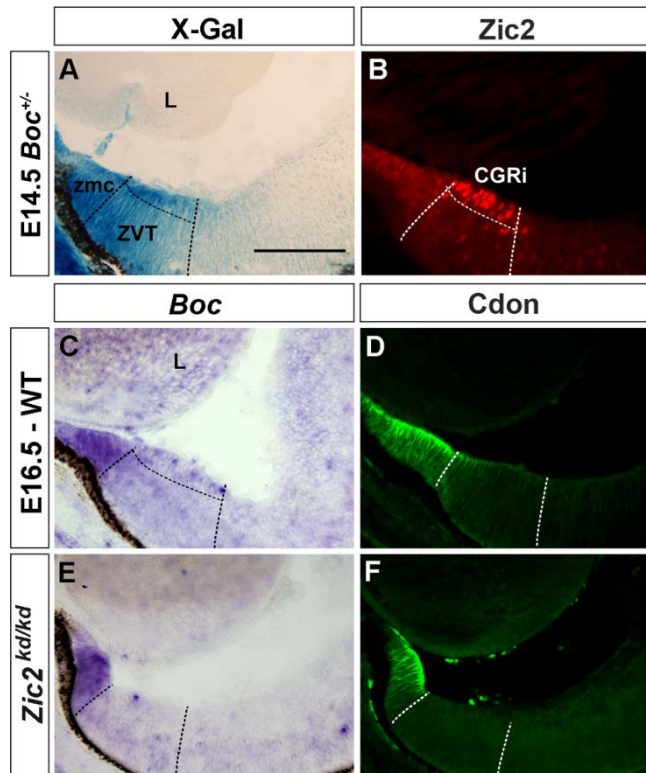


Figura 9. La expresión de *Boc* está reducida en la región VT de los embriones *Zic2^{kd/kd}*. Secciones frontales de embriones *Boc^{+/+}* en estadio E14.5 y E16.5 wt y *Zic2^{kd/kd}*. La tinción con X-Gal marca las células que expresan *Boc* (A). Inmunofluorescencia con anticuerpos α -*Zic2* que marcan las CGRi (B) o α -*Cdon* (D,F). A,B) *Boc* se expresa en la región VT de la retina coincidiendo con la expresión de *Zic2*. C-F) *Boc*, no se expresa en la región VT de la retina de los embriones *Zic2^{kd/kd}*, pero se mantiene en la ZMC donde también se expresa *Cdon*. Barra de escala 200 μ m. A) Imagen cortesía de la Dra. Sánchez-Camacho.

EphB1, el principal gen diana de *Zic2* involucrado en el comportamiento de los axones de las CGR-i a nivel de línea media, es suficiente para guiar a los axones al tracto ipsilateral (Lee et al., 2008). Si *Boc* actuase de la misma manera, la expresión ectópica de *Boc* en la retina central debería ser suficiente para inducir un comportamiento ipsilateral en las CGRc, como ocurre cuando *EphB1*, *Zic2* o *FoxD1* son sobrexpresados en las CGRc (Carreres et al., 2011; Garcia-Frigola et al., 2008; Lee et al., 2008; Petros et al., 2009). Para corroborar esta posibilidad nosotros comparamos la eficiencia por la cual la expresión ectópica de *Boc*, *Zic2*, *FoxD1* o la combinación de *Zic2+Boc* en las CGRc cambian la trayectoria de los axones, forzándolos a introducirse en el tracto ipsilateral. Embriones wt en estadio E13.5 fueron electroporados *in utero* en la retina central y analizados en estadio E18.5. Como ha sido descrito previamente, la electroporación a E13.5 permite una transfección mayoritaria de las CGR de la retina central (Garcia-Frigola et al., 2007) (Fig. 10A).

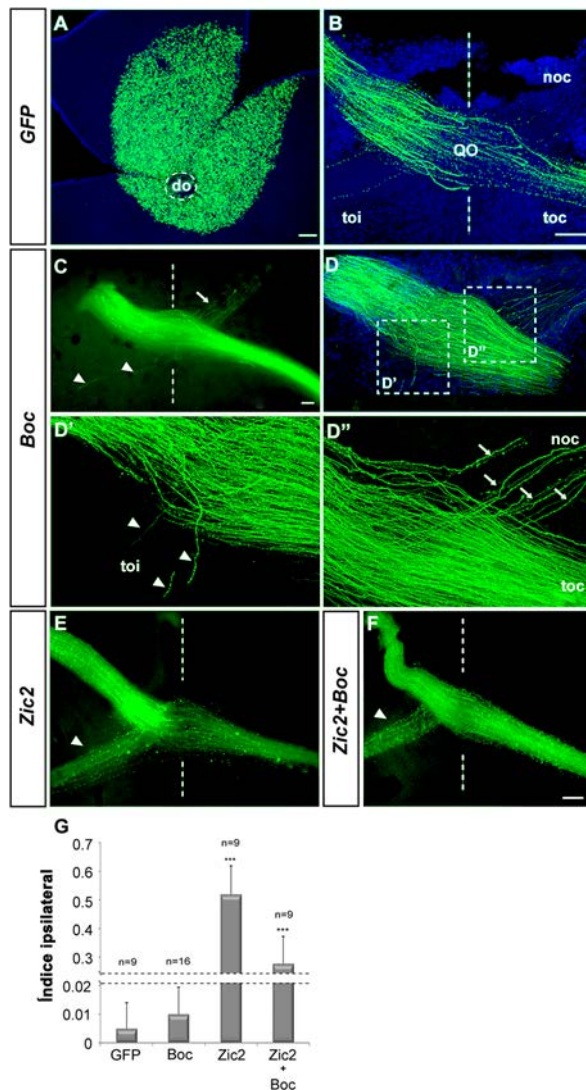


Figura 10. Boc no es suficiente para activar el programa ipsilateral.

Imagen confocal de una retina electroporada montada en plano (A), visión ventral de cerebros (C,E,F) o de secciones del QO (D-D'') de embriones E18.5 que fueron electroporados en E13.5 con plásmidos de expresión con *GFP* solo (A,B) o con *GFP* y *Boc* (C-D''), *Zic2* (E) o *Zic2* y *Boc* (F). A) Las electroporaciones se produjeron en la retina central. C-D'') En embriones electroporados con *Boc*, la mayoría de los axones cruzan la línea media (marcada con línea de puntos) (C), solo algunos axones se introducen en TOI o en el NOC (D-D''). G) El gráfico compara la diferencia en los índices de ipsilateralidad en los embriones electroporados con los diferentes plásmidos, *** $p < 0.001$ comparado con *GFP* (t-Student). Barra de escala 100 μ m.

La electroporación con un plásmido control pCAG-*GFP*, nos permitió observar que la mayoría de los axones *GFP* positivos cruzan la línea media, aunque en raras ocasiones algunos axones se introducen en el tracto óptico ipsilateral o en el nervio óptico contralateral (Fig. 10B). La mayoría de los axones de las CGRc en las que se había forzado la expresión de *Boc*, presentaron un comportamiento normal a nivel de la línea media introduciéndose en el tracto óptico contralateral (Fig. 10C,D), aunque se apreció un leve aumento de axones que se introdujeron en el nervio óptico contralateral o en el tracto óptico ipsilateral (Fig. 10D-D''), tal y como había sido descrito por Fabre et al. (2010). Dicha porción de axones representa una fracción muy pequeña con respecto al resto de fibras de las CGRc electroporadas con pCAG-*Boc* (Fig. 10G), en contraste con la significativa proporción de axones que cambian su trayectoria en las CGRc electroporadas con pCAG-*Zic2* (Fig. 10G). Cabe remarcar que la co-electroporación de pCAG-*Zic2* y pCAG-*Boc* no provoca un aumento significativo en el número de axones forzados a entrar en el tracto ipsilateral en comparación con

los axones de las CGRc que sobreexpresaban *Zic2* (Fig. 10G), lo que reafirma que Boc por si solo es insuficiente para activar la ipsilateralidad en los axones de las CGR que han sido comprometidas como contralaterales.

4.1.3 Boc es necesario para mantener el correcto número de CGR *zic2* positivas en la región VT de la retina.

Los datos muestran que Boc es necesario para mantener la proporción de fibras que proyectan ipsilateralmente. Pero, Boc por si solo es incapaz de inducir un comportamiento ipsilateral en las CGRc. A la vista de estas observaciones, pensamos que sería posible que Boc y la señalización de Shh pudieran estar involucradas en la especificación de las CGRi, de forma similar a la observada en las neuronas ventrales del tubo neural del pez cebra (Bergeron et al., 2011).

Shh es secretado desde las CGRc adyacentes a las CGRi (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Este hecho indica la posibilidad de que Shh podría activar la expresión de *Zic2* en las CGRi, como se había observado durante la formación del patrón en el prosencéfalo (Brown et al., 2003; Sanek et al., 2009). Cabe destacar, que la expresión de otros receptores de Shh, como son *Cdon* o *Gas1*, con los cuales Boc presenta cierta redundancia en su función en algunos tejidos (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011), no se expresan en las CGRi, siendo Boc el único que se expresa en la región VT de la retina (Fabre et al., 2010; Lee et al., 2001; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008) (Fig. 9A-D). Además, la pérdida de *Boc* podría tener un impacto significativo sobre la recepción de la señalización de Shh por parte de la CGRi.

Para dilucidar esta posibilidad, comparamos la distribución del ARNm de *Zic2* y de su proteína, así como el ARNm de *Sert*, una de sus dianas directas (Garcia-Frigola and Herrera, 2010), tanto en retinas wt como en *Boc*^{-/-} de embriones en estadios E16.5, E18.5 y en ratones recién nacidos (Fig. 11 A-M). La expresión de *Zic2* comienza a reducirse a partir del estadio E17.5, pero aún se puede observar en estadios post natales de animales wt (Fig. 11A, E, I). La cuantificación, por parte de la Dra. Sánchez-Arrones, del número de células *Zic2* positivas en la región VT de la retina de embriones wt y *Boc*^{-/-} no presenta diferencias significativas a E16.5 (Fig. 11M) como ya fue descrito por (Fabre et al., 2010) a E15.5. Aunque, hemos observado que en *Boc*^{-/-} las células *Zic2* positivas aparecen agrupadas cerca de la región del margen ciliar (Fig. 11B). Este agrupamiento fue más evidente en estadios posteriores a E16.5 (Fig. 11F, J), cuando se observó una disminución de la expresión de *Zic2* y de *Sert* (Fig. 11G, H, K, T), y una reducción significativa de las células *Zic2*

positivas a partir de E18.5 en comparación con el wt (Fig. 11M). Este cambio podría ser causado por muerte celular, sin embargo, no se observaron diferencias entre animales wt y *Boc*^{-/-} en el análisis de TUNEL a estadios E18.5 y P0/1. Además, no se detectaron diferencias en la proliferación entre animales wt y *Boc*^{-/-}, analizando mediante la tinción de fosfo-histona H3. Estos datos sugieren que cambios en la proliferación o la muerte celular no son los responsables del fenotipo observado.

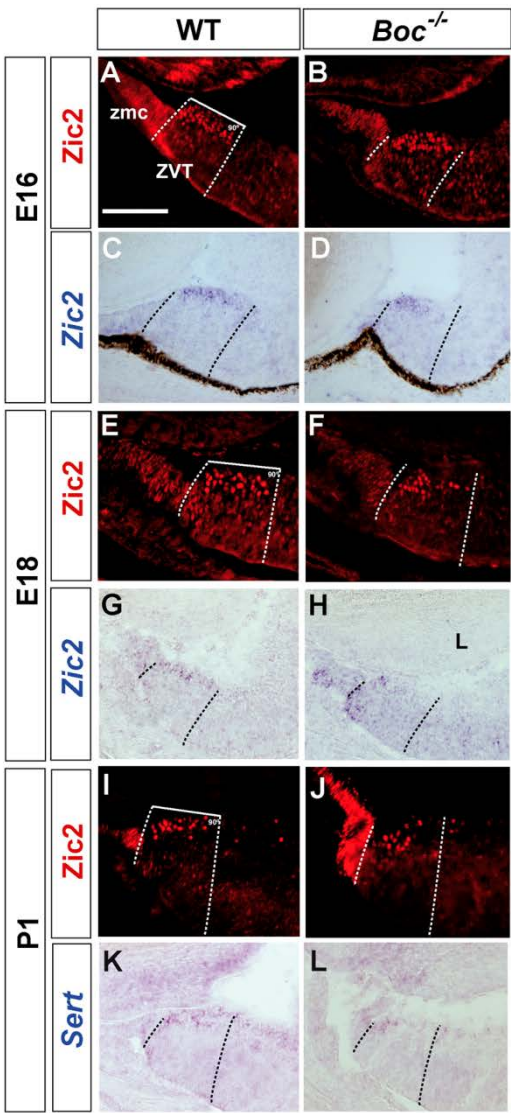
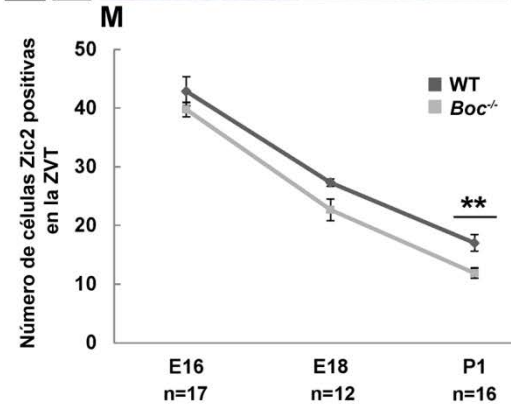


Figura 11. Boc es necesario para mantener el correcto número de CGRi.

Secciones frontales de animales wt y *Boc*^{-/-} en estadio E16.5 (A-D), E18.5 (E-H), P1 (I-T). Secciones teñidas mediante inmunofluorescencia con anticuerpo α-Zic2 (A,B,E,F,I,J) o con hibridación *in situ* con sondas Zic2 (C,D,G,H) y Sert (K,T). A-H) La pérdida de tinción Zic2 es precedida de una reducción de expresión del ARNm de Zic2 (Comparar C y G con D y H). A-T) En los animales *Boc*^{-/-} hay una reducción progresiva del número de CGRi marcadas por ZIC2/Sert en la región más distal a la ZMC. M) El gráfico representa el número de células Zic2 positivas en la región VT de animales wt (línea oscura) y *Boc*^{-/-} (línea clara) a diferentes estadios, **p<0.01 (t-Student). Barra de escala 200µm. Imágenes cortesía de la Dra Sánchez-Arrones.



4.1.4 Boc es necesario para mantener el correcto número de células Islet2/Shh positivas dentro de la región VT de la retina.

Para corroborar que la disminución de células Zic2 positivas no se debía a un proceso de muerte celular o a una disminución en la proliferación, realizamos un análisis inmunohistoquímico sobre secciones de criostato de retinas a estadios E16.5, E18.5 y P0, usando anticuerpos contra Brn3b, el cual marca la mayoría de las CGR, incluyendo las de la región VT (Erkman et al., 1996; Quina et al., 2005; Wang et al., 2002). Los animales wt y los *Boc*^{-/-} presentan el mismo número de células Brn3b positivas en la región VT (Fig. 12A,A',E,E',I,I',P).

La inactivación genética de *Islet2* en embriones de ratón provoca un aumento de células Zic2 positivas, las cuales se acumulan en la región VT de la retina. Este aumento de células Zic2 positivas en los mutantes *Islet2*^{-/-} provoca un aumento de la proyección ipsilateral, sugiriendo un papel represivo de *Islet2* sobre la expresión de *Zic2* en la región VT, controlando por tanto la visión binocular (Pak et al., 2004). Nuestros resultados muestran que mientras el número de Brn3b no cambia en los *Boc*^{-/-}, las células Zic2 positivas se ven disminuidas. Por lo tanto proponemos la existencia de una posible regulación mutua entre *Zic2* y *Islet2*, en la cual la disminución de los niveles de Zic2 favorecería la generación de células *Islet2* positivas.

En la región VT de la retina, las células *Islet2* positivas son generadas durante los estadios E17.5 y P0 (Drager, 1985; Drager and Olsen, 1980), entremezclándose con las células Zic2 positivas. La realización de un doble marcaje con Zic2 e *Islet2*, con técnicas inmunohistoquímicas y de hibridación *in situ*, revelaron que en la retina de los ratones *Boc*^{-/-} a estadios E18.5 y P0, el número de células *Islet2* positivas en la región VT está significativamente incrementado, coincidiendo con la disminución de las células Zic2 positivas (Fig. 12F, F', G, G', J, J', K, K', P). En concordancia con el aumento de *Islet2* en el mutante *Boc*^{-/-} y el hecho que *Shh* se expresa en las CGRc (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008), observamos que el ARNm de *Shh* es más abundante en la región VT de la retina de los mutantes *Boc*^{-/-} en los estadios E18.5 y P0 (Fig. 12D, D', H, H', L, L').

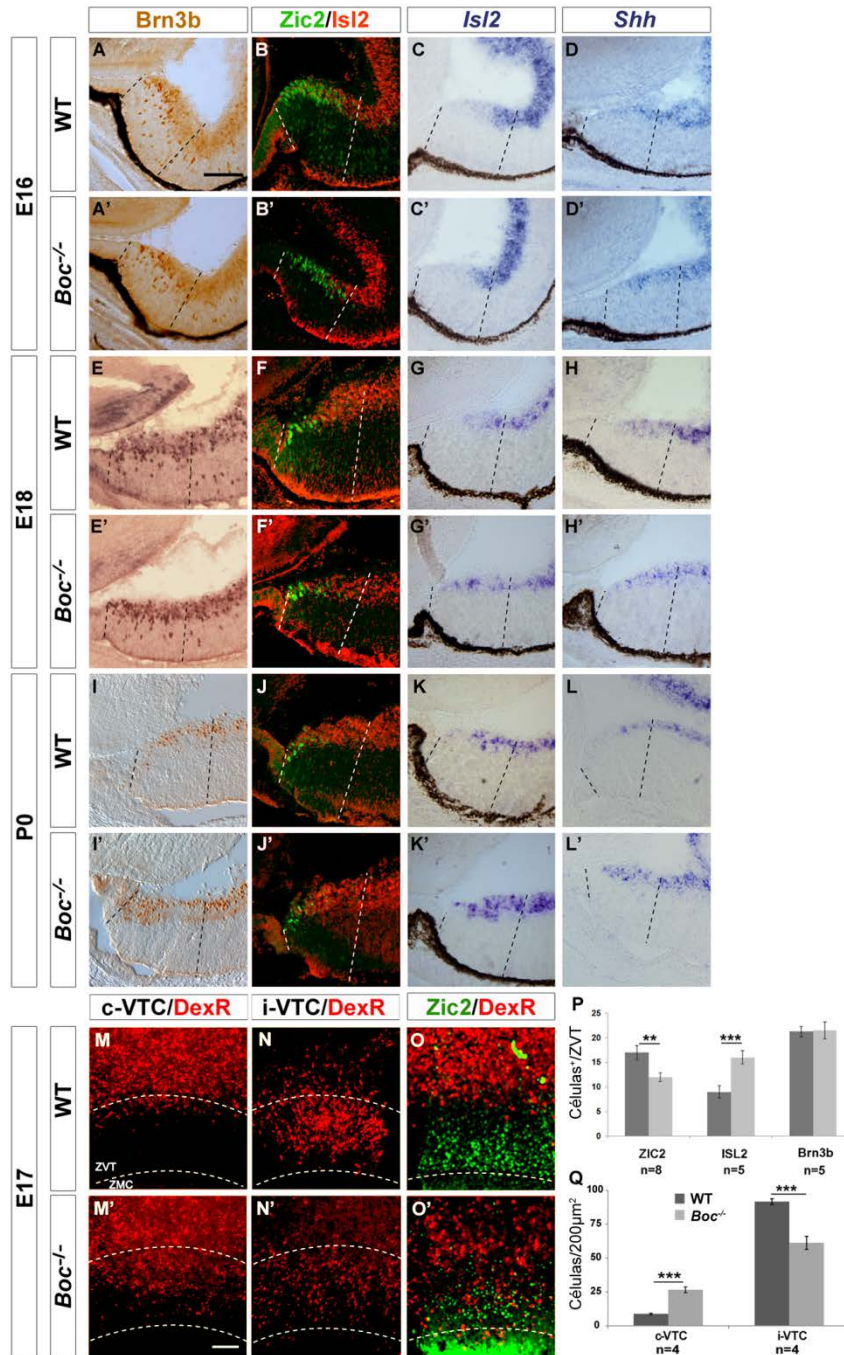


Figura 12. Boc restringe la expresión de *Islet2/Shh* en la región VT.

Secciones de retinas de embriones en estadio E16.5 (A-D'), E18.5 (E-H') y P0 (I-L') teñidas mediante inmunohistoquímica con α -Brn3b, inmunofluorescencia con α -Zic2 y α -Islet2 o con hibridación *in situ* con sondas para *Islet2* y *Shh*. A-L', P) En la región VT de la retina (delimitada con dos líneas discontinuas) de animales *Boc*^{-/-}, existe un incremento de células que expresan *Islet2* y *Shh* que coincide con una disminución de células Zic2 positivas. El número de CGR totales marcadas con Brn3b no presenta variación. M-O', Q) Visión de la región VT de retina montadas en plano de embriones E17 con trazados unilaterales retrogrados del TO mediante dextrano rodaminado, se presentan las retinas contralaterales al trazado (M, M', O, O') e ipsilaterales (N, N') de animales wt y *Boc*^{-/-}. En animales *Boc*^{-/-}, existe un incremento en el número de CGRc retrotrazadas dentro de la región VT, que coincide con una disminución de las CGRi retrotrazadas (Q). P, Q) Los histogramas representan la media de células Zic2, Islet2 y Brn3b positivas presentes en la región VT de la retina en animales P0 wt y *Boc*^{-/-} (P), y el número de células retrotrazadas presentes en la región VT de retinas ipsilaterales y contralaterales al trazado en animales wt y *Boc*^{-/-} a E17 (Q), **p<0.01, ***p<0.001 (t-Student). Barra de escala 100 μ m.

Todos estos datos sugieren que en la región VT las CGRi (Zic2 positivas) son re-especificadas como CGRc (Islet2 positivas). Si este fuera el caso, la proyección contralateral desde la región VT de las retinas debería verse incrementada. Para corroborar esta posibilidad, realizamos trazados retrógrados de las proyecciones visuales a estadio E17.5. Para ello inyectamos unilateralmente dextrano-Rhodaminado a nivel de tracto óptico en preparaciones vivas de cerebros expuestos (Herrera et al., 2003). El posterior análisis de las retinas montadas en plano confirmó que en la retina ipsilateral al trazado de los embriones wt, la mayoría de las CGR trazadas se encuentran en la región VT, mientras que en la retina contralateral al trazado observamos solamente algunas CGR marcadas en la región VT (Fig. 12M-O). En el mutante *Boc*^{-/-}, en cambio, observamos una reducción estadísticamente significativa en la región VT de las CGR trazadas ipsilateralmente, además se observó un incremento de CGR trazadas en la región VT provenientes del lado contralateral, que coincide con un aumento de células Zic2 negativas en esta región. Los datos sugieren que, en ausencia de *Boc*, la generación de las CGR en la región VT de la retina se ve desplazada en favor de las CGRc.

4.1.5 La organización de las proyecciones de la retina al NGLd está alterada en la ausencia de *Boc*.

Las CGR ipsilaterales y contralaterales de la región VT de la retina proyectan en regiones bien definidas en el NGL dorsal. La proyección ipsilateral forma un parche discreto en la región dorso-medial del NGL, mientras que la proyección contralateral proveniente de la región VT de la retina proyecta en una pequeña región en la parte más dorsal del NGL dorsal (Jaubert-Miazza et al., 2005; Rebsam et al., 2009). Si las células Zic2 positivas de proyección ipsilateral estuviesen re-especificadas como CGRc (Islet2 positivas) en la región VT del mutante *Boc*^{-/-}, sus proyecciones en el NGLd deberían verse alteradas, reduciéndose la proyección en el campo ipsilateral y aumentándose en la región más dorsal del NGLd.

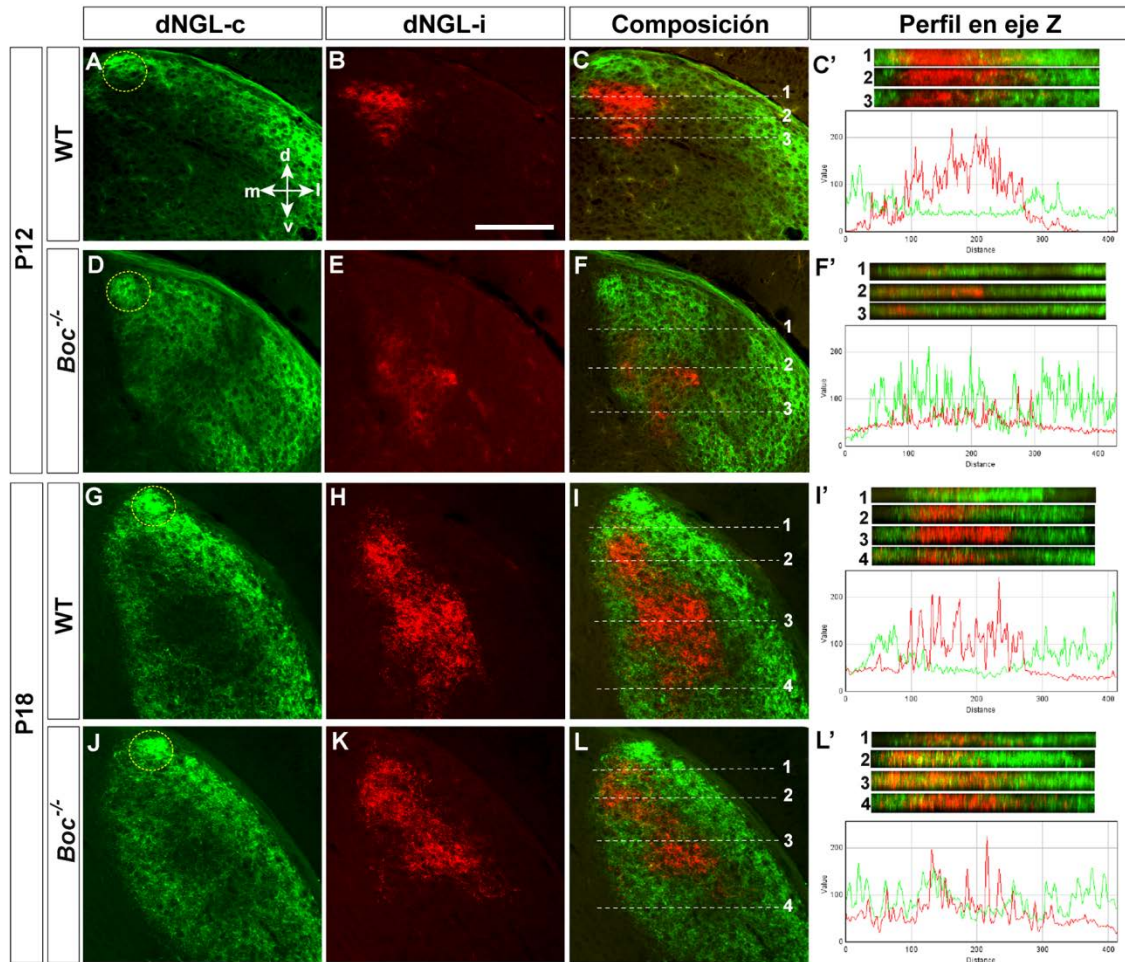


Figura 13. Organización de la proyección retino-geniculado en animales postnatales *Boc*^{-/-}

Análisis confocal de secciones frontales del NGLd de animales wt y *Boc*^{-/-} en estadio P12 y P18. La proyección se trazó mediante la inyección en el ojo ipsilateral de la subunidad β de la toxina colérica acoplada a un fluorocromo Alexa 594 (rojo) y en el ojo contralateral acoplada a Alexa 488 (verde). Análisis en el eje Z de la proyección en el NGLd, (las líneas discontinuas marcan el lugar del análisis en el eje Z de la muestra, C', F', I', L'), indicándose debajo los perfiles de fluorescencia del análisis 2 (C', F') y 3 (I', L'). En los animales wt la proyección ipsilateral (rojo) se concentra en la región dorso-central del NGLd y es rodeada por las proyecciones contralaterales (verde), en cambio en *Boc*^{-/-} la proyección ipsilateral es reducida en esta región, habiendo un incremento en las fibras contralaterales en la parte más dorsal del NGLd (marcado con un círculo punteado), lugar donde proyectan las CGRc tardías de la región VT. Barra de escala 250 μ m.

Para comprobar este hecho, realizamos el trazado de la vía visual con la subunidad B de la toxina colérica acoplada a un fluoróforo. Cada ojo fue inyectado con un fluoróforo diferente (Alexa-488 o Alexa-555) y se analizó la distribución de las proyecciones al NGLd a P12, P18, estadios en los que las proyecciones de las CGR ipsilaterales y contralaterales comienzan el proceso de segregación a nivel de NGL, y P30, estadio en el cual las proyecciones a nivel de NGL están totalmente segregadas (Jaubert-Miazza et al., 2005). Como se ha descrito previamente (Jaubert-Miazza et al., 2005; Rebsam et al., 2009), la proyección ipsilateral (rojo) en animales wt a P12 (n=4) forma un pequeño parche discreto en la región dorso-medial del NGLd. Este parche se ve rodeado de la proyección contralateral (verde), la cual ocupa la mayoría del NGLd

con un pequeño parche en la punta más dorsal, el cual representa la proyección de las CGRc provenientes de la región VT de la retina (Fig. 13A-C). En los animales *Boc^{-/-}*, en cambio, observamos una reducción del 32% de la proyección ipsilateral en la región dorso-medial (Fig. 13E; n=4), mientras el parche dorsal de las CGRc se vio más intenso (Fig. 13D). Cabe remarcar, que el análisis del mutante *Boc^{-/-}* por microscopía confocal revela un solapamiento a nivel de NGLd entre la proyección proveniente del ojo derecho con la del izquierdo (Fig. 13D-F). Este solapamiento fue confirmado mediante el análisis de distribución de la fluorescencia en el plano Z (Fig. 13C', F', I', L'). En los animales wt, la proyección ipsilateral forma un parche bien definido de unos 175µm de ancho con una distribución homogénea de la fluorescencia y un mínimo solapamiento con las proyecciones contralaterales (verde) que provienen del otro ojo (Fig. 13C'). En los mutantes *Boc^{-/-}*, en cambio, la fluorescencia proveniente de la proyección ipsilateral (rojo) se observaba dispersa y con una intensidad desigual, ocupando una región más amplia que en el wt de unos 400µm, la cual solapaba ampliamente con el espectro de la fluorescencia verde que corresponde a las proyecciones contralaterales del otro ojo (Fig. 13F'). Este solapamiento en el mutante *Boc^{-/-}* podría estar reflejando el retraso de la segregación de las fibras ipsilaterales y contralaterales, la presencia de fibras ipsilaterales que se introducen en el tracto contralateral y proyectan en su región del NGLd como sugeriría Fabre et al. (2010), o incluso puede reflejar una proyección colateral de fibras contralaterales que sinaptan con las neuronas del NGLd desocupadas, debido a la disminución de la proyección ipsilateral.

Los mutantes *Boc^{-/-}* presentan una reducción del 33% del área de proyección ipsilateral a P18 en comparación con sus hermanos wt (n=3) (Fig. 13G-I, J-L), y las proyecciones ipsilaterales y contralaterales se ven aún entremezcladas como confirmamos con el análisis por microscopía confocal de la fluorescencia roja y verde en el plano Z (Fig. 13I', J'). Puntos de fluorescencia roja (ipsilateral) fueron detectados en regiones que en un animal wt son normalmente ocupadas por proyecciones que provienen del ojo contralateral (Fig. 13I', L'), incluyendo la región más dorsal del NGLd (Fig. 13I'1, L'1), en la cual proyectan las CGRc tardías generadas en la región VT de la retina (Rebsam et al., 2009). Puntos de fluorescencia verde (contralateral) invadieron también la región dorso-central del NGLd en los animales *Boc^{-/-}*, aunque esto estuvo menos definido (Fig. 13I', L').

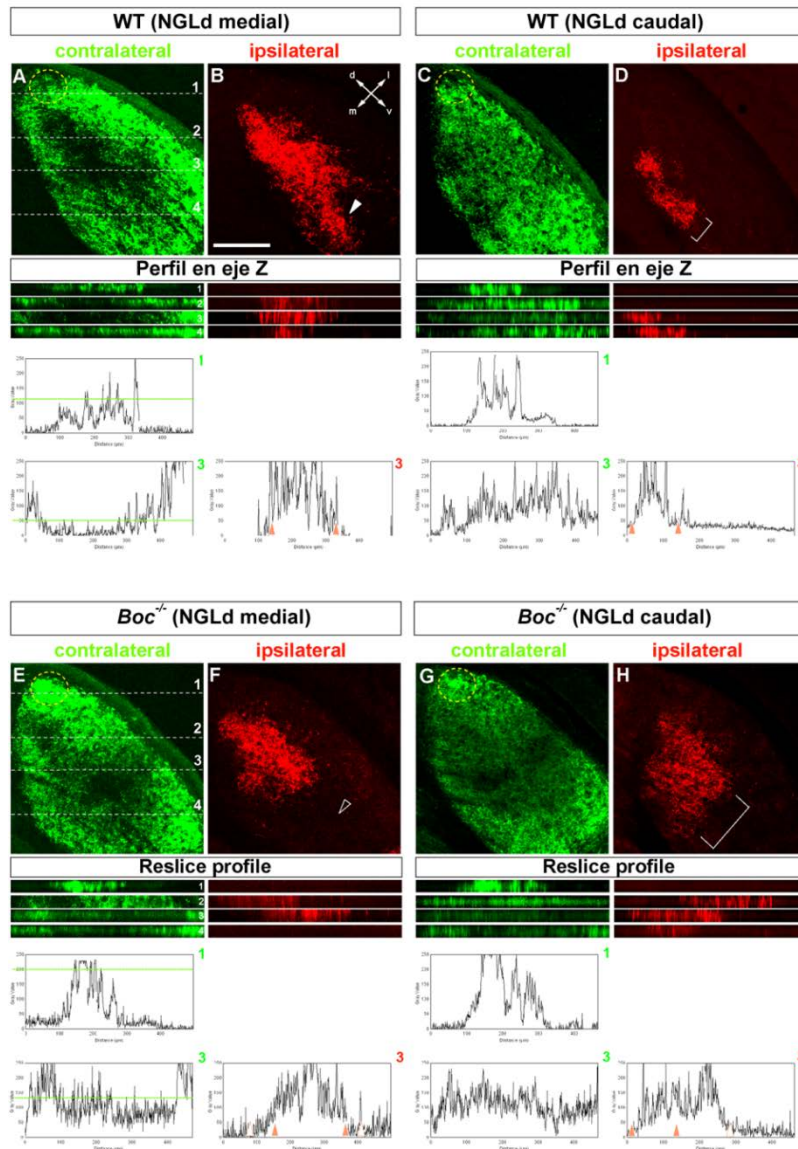


Figura 14. Organización de la proyección retino-geniculada en animales *Boc*^{-/-} adultos.

Análisis confocal de secciones frontales del NGLd de animales wt y *Boc*^{-/-} en estadio P30 a diferentes niveles axiales. Las proyecciones se trazaron anterogradamente con toxina colérica acoplada a fluorocromos. Análisis en el eje Z de diferentes regiones del NGLd, mostradas en **A** para **A-D** y en **E** para **E-H**. Los gráficos muestran el perfil de fluorescencia rojo (ipsilateral) y verde (contralateral). Barra de escala 200μm.

El análisis de animales P30 (n=4), en los cuales la segregación dependiente de actividad ya está completamente formada, confirmó que en el NGLd de los mutantes *Boc*^{-/-}, el campo ipsilateral está reducido en las regiones mediales (Fig. 14A,B,E,F), mientras que en las regiones más caudales del campo ipsilateral se observa una dispersión de las proyecciones ipsilaterales y un entrecruzamiento con las proyecciones contralaterales, comparándolo con los animales wt (Fig. 14A,C,E,G y sus respectivos cortes en el plano Z). Además, se observó una reducción del área ipsilateral de un 36,5% en el mutante *Boc*^{-/-}. Aunque por el contrario, se observó un aumento, con respecto a sus hermanos wt, en el marcaje de la región donde proyectan las CGRc tardías, como se puede ver en el análisis por microscopia confocal (Fig. 14A, C, E, G, ver perfil 1).

Los datos obtenidos muestran que, en el ratón *Boc*^{-/-}, el dominio ipsilateral del NGL dorsal es solamente innervado parcialmente por una pequeña cantidad de fibras provenientes del ojo contralateral, las cuales podrían representar proyecciones de las CGRi que han cruzado anormalmente la línea media como se propuso por Fabre et al. (2010). Aunque, los datos obtenidos apoyan más un cambio de identidad en las CGR de la región VT, ya que los animales *Boc*^{-/-} presentan un incremento notable de fibras en la región más dorsal del NGLd, región en la cual proyectan las fibras de las CGRc que se generan tardíamente en la región VT de la retina.

4.1.6 Existe un bucle regulatorio entre la expresión de *Zic2* y la señalización de Shh en la región VT de la retina.

Los datos obtenidos muestran que *Boc* es necesario para la generación de una apropiada proporción de CGRi y por lo tanto de la correcta proyección de fibras visuales a las regiones del NGL dorsal. Es sabido que *Boc* actúa como un receptor de alta afinidad de Shh, modulando la señalización de Shh (Allen et al., 2007; Tenzen et al., 2006). En otras regiones del sistema nervioso central se ha observado que la expresión de *Zic2* parece depender de la señalización de Shh (Brown et al., 2003; Hayhurst et al., 2008; Sanek et al., 2009). *Zic2*, a su vez, funciona como un modulador negativo de algunos genes diana de la vía de Shh (Sanek et al., 2009).

Nosotros postulamos que en la ausencia de *Boc*, el cual puede incrementar la sensibilidad a Shh (Bergeron et al., 2011; Tenzen et al., 2006), la señalización de Shh podría no estar lo suficientemente activa como para mantener la expresión de *Zic2*, cuya pérdida progresiva favorecería a la generación de un mayor número de CGRc tardías marcadas por la expresión de *Islet2* en la región VT de la retina. Apoyando esta hipótesis, observamos una disminución en las células *Zic2* positivas en estadio E18.5 que fue precedida de una disminución de la expresión de *Zic2* a E16.5 según muestran las hibridaciones *in situ* (Fig. 11C, D, G, H). En apoyo a estos datos, se observó una expansión de la expresión de *Shh* y *Islet2* en la región VT de las retinas de los ratones *Zic2*^{kd/kd} y *FoxD1*^{-/-} (Fig. 15A-I).

La existencia de un bucle de regulación entre *Zic2* y la señalización de Shh, similar al observado en el desarrollo del patrón del prosencefalo en el pez cebra (Sanek et al., 2009), fue corroborada expresando de forma ectópica Shh en la región VT de las retinas de embriones wt en estadio E13.5, mediante la electroporación *in utero*, que provocó una fuerte reducción de *Zic2* en las células electroporadas y en las de alrededor, analizadas dos días después de la electroporación (Fig. 15J-K'). Además, el análisis mediante qRT-PCR de los niveles de ARNm de *Shh* y *Boc*

después de una expresión ectópica de *Zic2* en la retina central, mediante electroporación *ex utero*, mostró una significativa reducción de la expresión de *Shh* y un aumento significativo de la expresión de *Boc*, veinticuatro horas después de la electroporación (Fig. 15L), consistente con lo observado en el mutante *Zic2^{kd/kd}*.

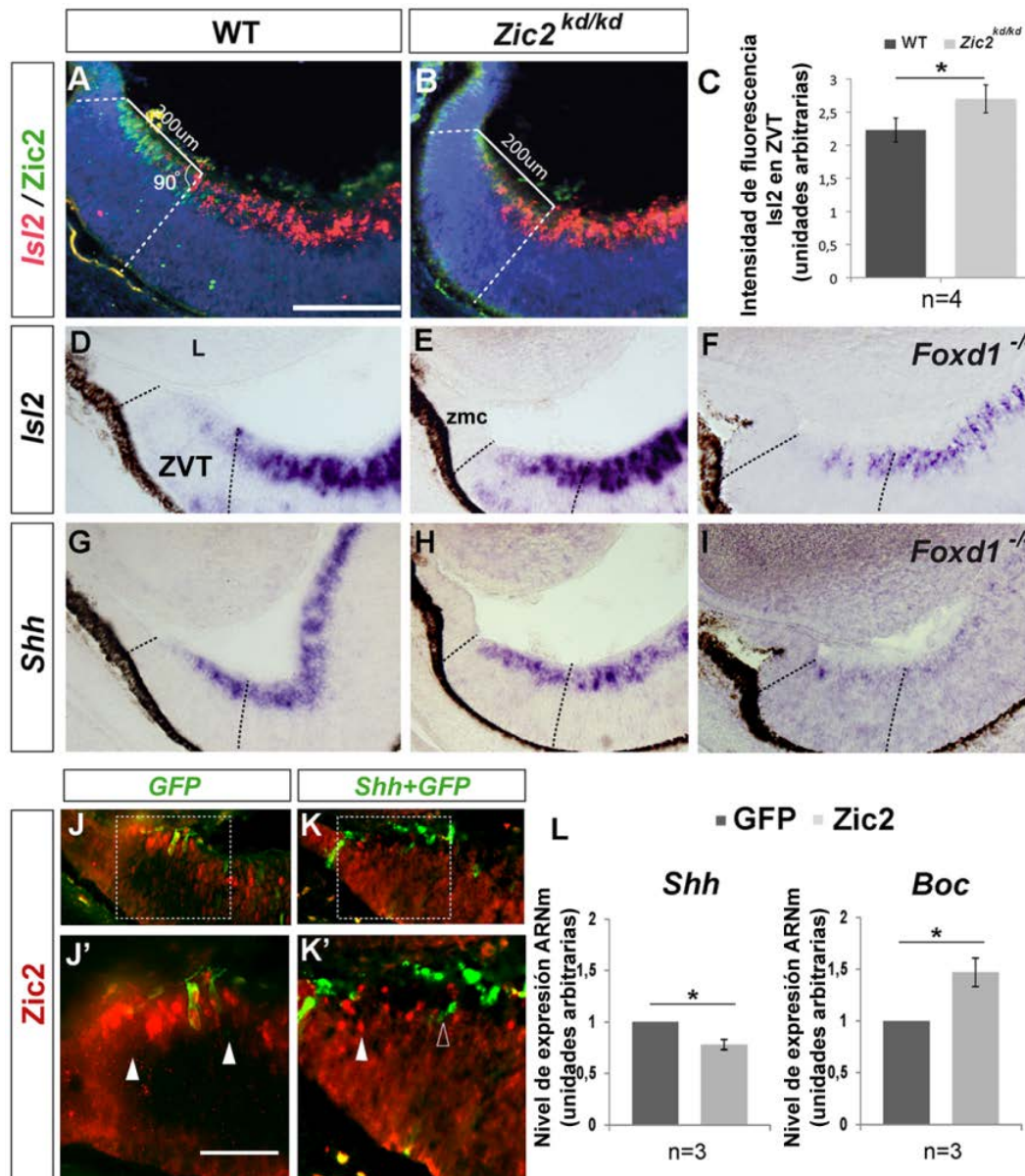


Figura 15. Bucle regulatorio entre *Zic2* y la señalización de *Shh* en la región VT de la retina. **A,B,D,I)** Secciones frontales de animales wt (**A,D,G**), *Zic2^{kd/kd}* (**B,D,H**), *Foxd1^{-/-}* (**F,I**) a estadio E16.5. Los embriones wt son de la misma camada que los *Zic2^{kd/kd}*, los hermanos wt de los *Foxd1^{-/-}* no se muestran ya que no presentan diferencias con los mostrados en **D** y **G**. **C)** Histograma representa el aumento de la fluorescencia en la tinción mediante hibridación in situ de *Isl2* en la región VT de animales *Zic2^{kd/kd}* en comparación con animales wt, **p*<0.05 (t-Student). **J-K')** Animales wt electroporados con plásmido *GFP* (**J, J'**) o con *GFP* y *Shh* (**K, K'**) en la región VT de la retina a estadios E15.5, fueron analizados a E18.5 mediante tinción inmunofluorescente α-*Zic2*. Existe una disminución de la tinción *Zic2* en la región donde se sobreexpresa ectópicamente *Shh* (**K, K'**), mientras que la tinción *Zic2* no se ve afectada en los que expresan solo *GFP* (**J, J'**). **L)** Análisis por RT-qPCR de los niveles de expresión de *Shh* y *Boc* en retinas centrales electroporadas *ex utero* de embriones E13.5 wt, después de 24h de cultivo. El análisis fue realizado con un conjunto de 8 retinas para cada gen y el experimento fue repetido tres veces, **p*<0.05 (Mann-Whitney). Barra de escala 100µm. **A, B)** Imágenes cortesía de la Dra. Herrera.

Capítulo II



Papel de Sfrp1/2 en la guía de los axones de las CGR.

4.2.1 *Sfrp1* y *Sfrp2* se expresan en ojo y se distribuyen a lo largo de la vía visual en ratón

Estudios previos del laboratorio han mostrado que *Sfrp1* y *Sfrp2* se expresan durante el desarrollo de ojo de vertebrados. En pollo y pez medaka, la expresión de *Sfrp1* en la vía visual se localiza en el neuroepitelio de la retina, en el DO, QO y en la porción inicial del TO (Esteve et al., 2004; Esteve et al., 2003; Rodriguez et al., 2005; Terry et al., 2000). Por el contrario, en ratón, *Sfrp1* solo se expresa en el epitelio pigmentario de la retina, el margen ciliar (Esteve et al., 2011a; Liu et al., 2003a) y la capa de las ganglionares (Fig. 16A), pero no en el QO ni en el TO (Fig. 16C). La proteína *Sfrp1* expresada por las CGR se localiza a lo largo del axón de las CGR tanto *in vivo* como *in vitro* (Fig. 16B, D, E).

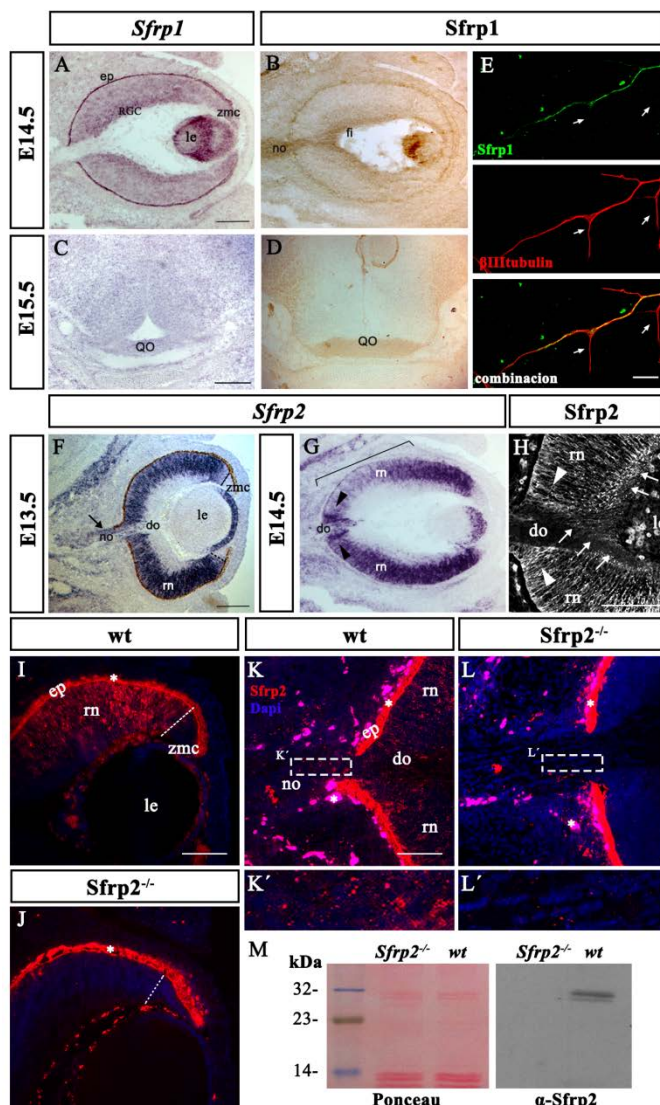


Figura 16. Expresión de *Sfrp1/2* en la vía visual proximal.

A-D, F-L') Secciones frontales de retina de embriones wt a estadio E14.5 (**A, B, G, H**) y E13.5 (**F, I, K, K'**), y de diencéfalo E15.5 (**C, D**), secciones de retina en embriones *Sfrp2*^{-/-} a E13.5 (**J, L, L'**). Los secciones fueron hibridadas con sondas *Sfrp1* (**A**) o *Sfrp2* (**F, G**) o inmunoteñidas mediante α -*Sfrp1* (**B, D**) o α -*Sfrp2* (**H-L'**). **E**) Cultivos disociados de retina de embriones wt a E14.5, fueron inmunoteñidas mediante α -*Sfrp1* (verde) y α - β III-tubulina (rojo). *Sfrp1* se expresa en las CGR, el EP, el margen ciliar y en la lente. Remarcar que *Sfrp1* no se expresa en la región del QO en el diencéfalo. *Sfrp1* es abundante en la capa de las fibras, en el NO y en el QO (**B, D**). La acumulación de *Sfrp1* en los axones se confirmó en cultivos de neuronas, en donde *Sfrp1* se acumula en la neurita principal, pero está ausente en las neuritas laterales (**E**, flechas). *Sfrp2* se expresa en la zona proliferativa de la retina neural y en la porción inicial del NO (**F**, flechas) y en las células de la glía del DO (**G**, puntas de flecha) y en la lente, aunque está ausente de las CGR y de la ZMC (**F, G**). La expresión de *Sfrp2* presenta un gradiente dorso-central a E14.5 donde comienza a disminuir su expresión (**G**, corchete). *Sfrp2* se detectó en las nuevas CGR y en sus axones (flechas, **H**) y en las células del NO (**K, K'**), se comprobó la especificidad del anticuerpo mediante tinciones en secciones de embriones *Sfrp2*^{-/-} (**I-L'**) y western blot de extractos de retinas wt y *Sfrp2*^{-/-} purificados mediante bolas de heparina (**M**). En **I, J**, los asteriscos marcan señales autofluorescentes. Barras de escala 250 μ m (**F, G**), 200 μ m (**A-D**), 100 μ m (**I-L**), 20 μ m (**E**). Imágenes cortesía de la Dra. Marcos y la Dra. Esteve.

La expresión de *Sfrp2* en pollo se localiza en la capa de las CGR (Lin et al., 2007), por el contrario en ratón *Sfrp2* se expresa mayoritariamente en el neuroepitelio indiferenciado de la retina y en la porción proximal del DO (Fig. 16F,G), mostrando un patrón de expresión complementario a *Sfrp1*. Durante el desarrollo del ojo, la expresión de *Sfrp2* muestra una progresiva disminución en la región central de la retina, generándose un gradiente en el cual la región central presenta bajos niveles de expresión de *Sfrp2* y la región periférica dorsal presenta altos niveles; en cambio la expresión de *Sfrp2* en región ventral de la retina presenta una distribución uniforme, con altos niveles en las células gliales que van a formar el DO (Morcillo et al., 2006)(Fig. 16F,G)

La distribución de la proteína de *Sfrp2* a E13.5 en ratón, se localiza en los progenitores de la retina, además se observa su acumulación en las CGR que son generadas y en sus axones, tanto en la capa de las fibras como en la parte del axón que abandona la retina por el DO (Fig. 16H, I, K, K'), también se observa su presencia en las células del DO. En cambio, *Sfrp2* está ausente del margen ciliar (Fig.16I). Para asegurarnos de la solidez de los resultados obtenidos con inmunofluorescencia, se realizaron controles de especificidad del anticuerpo con animales *Sfrp2*^{-/-} tanto en inmunofluorescencia como en western blot (Fig. 16J, L, L', M)

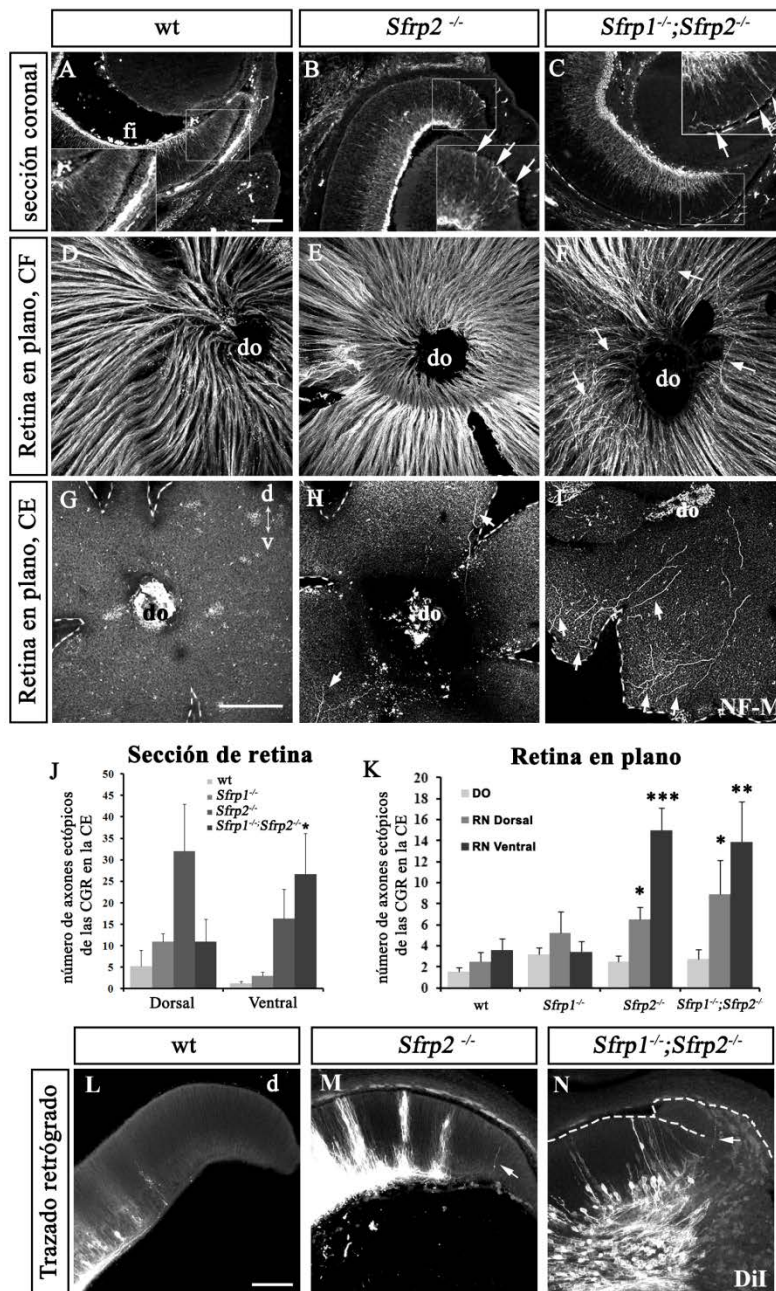
Los datos sugieren que la expresión de *Sfrp1* y *Sfrp2* difiere entre especies durante el desarrollo de la vía visual. En ratón, el patrón de expresión y su distribución sugieren un posible papel de los Sfrps en el establecimiento de la trayectoria de los axones de las CGR.

4.2.2 Sfrp1 y Sfrp2 son necesarios para la correcta guía de los axones de las CGR en la retina.

La Dra. Marcos investigó si la inactivación genética de *Sfrp1* y *Sfrp2* tenía consecuencias funcionales en el crecimiento de los axones de las CGR. Puesto que *Sfrp1* y *Sfrp2* se expresan ambos en la copa óptica, estudiamos los posibles defectos en la guía de los axones en la retina, usando para ello los mutantes simples y dobles mutantes.

Una vez que las CGR se han generado, sus axones crecen en la capa de las fibras de manera radial hasta llegar al DO situado en el centro de la retina. Las primeras CGR que se generan se localizan cerca del DO, y por tanto sus axones tienen un corto crecimiento dentro de la retina. En cambio las CGR generadas más tardíamente son localizadas en la periferia de la retina, por lo que sus axones tienen

que realizar un largo trayecto dentro de la capa de las fibras hasta llegar al DO por donde abandonarán la retina (Bao, 2008).



Student). L-N) Secciones coroneales de trazados retrogrados de embriones wt (L), *Sfrp2*^{-/-} (M), *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (N), algunos axones toman trayectorias anormales (M, N, flechas). Barra de escala 200 μ m. Imágenes cortesía de la Dra. Marcos.

La Dra. Marcos visualizó la trayectoria de los axones de las CGR dentro de la retina mediante inmunotinción con anticuerpos contra Neurofilamento M, filamento intermedio que se localiza principalmente en el axón. Las secciones de criostato coroneales y las retinas montadas en plano de embriones wt y mutantes fueron marcadas con anticuerpos α -Neurofilamento M (Fig. 17^a-I). Las retinas de embriones

wt, al igual que las de los embriones *sfrp1*^{-/-}, presentan una organización radial de fascículos situados en la capa de las fibras que convergen en el DO (Fig 17A, D, G, J, K). En cambio, tanto los mutantes *Sfrp2*^{-/-} como los dobles mutantes presentan un incremento significativo del crecimiento ectópico de los axones de las CGR hacia las capas profundas de la retina, dándose este crecimiento aberrante mayoritariamente en la retina periférica (Fig.17B, C, E, F, H, I, J, K). El análisis confocal de las capas profundas de las retinas montadas en planos y teñidas con anti-Neurofilamento M reveló la presencia significativa de pequeños fascículos ectópicos (Fig. 17 B, C, H, I, J, K). Este fenotipo también se ha descrito en la inactivación de la señalización Slit/Robo (Thompson et al., 2009; Thompson et al., 2006b). El crecimiento ectópico de las fibras es más abundante en la retina periférica ventral y ausente cerca del DO.

La frecuencia de estos defectos fue mayor en todos los doble mutantes en comparación con los mutantes simples de *Sfrp1*^{-/-} y *sfrp2*^{-/-}. Esto sugiere una redundancia funcional entre los dos Sfrps en la retina como se ha descrito anteriormente (Esteve et al., 2011a; Satoh et al., 2006). A pesar de esta redundancia, los mutantes *Sfrp2*^{-/-} presentaron un incremento en estas fibras ectópicas mayor que los mutantes de *Sfrp1*^{-/-} (Fig. 17J, K). Además, el mutante *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} presentó fascículos de axones que cambiaban su trayectoria antes de entrar en el DO, creciendo perpendicularmente al plano principal de crecimiento (Fig. 17F).

La Dra. Marcos observó, mediante trazado retrógrado desde el tracto óptico, que algunos de estos axones con trayectorias erróneas acaban de todas formas saliendo de la retina (Fig. 17L-N).

Para definir más precisamente la trayectoria de los axones de las CGR de la periferia dentro de la retina y estimar su frecuencia, la Dra. Marcos visualizó la trayectoria discreta de pequeños fascículos mediante el trazado con Dil/DiO en la retina periférica dorsal y ventral respectivamente (Fig. 18A). Este enfoque nos permitió observar ocasionalmente pequeños bucles de fascículos al entrar al DO tanto en el wt como en el mutante *Sfrp1*^{-/-}, siendo estos bucles más numerosos y evidentes en el doble mutante *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (entorno al 80% de las retinas del doble nulo presentaban estos bucles frente al 10% de los wt o *Sfrp1*^{-/-})(Fig. 18B-H). Las retinas de los mutantes *Sfrp2*^{-/-} también presentaron un número elevado de estos defectos con respecto al wt, aunque en menor frecuencia que los *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (Fig. 18H). Denótese que los principales defectos se localizan en la retina periférica ventral (Fig. 17J,K)

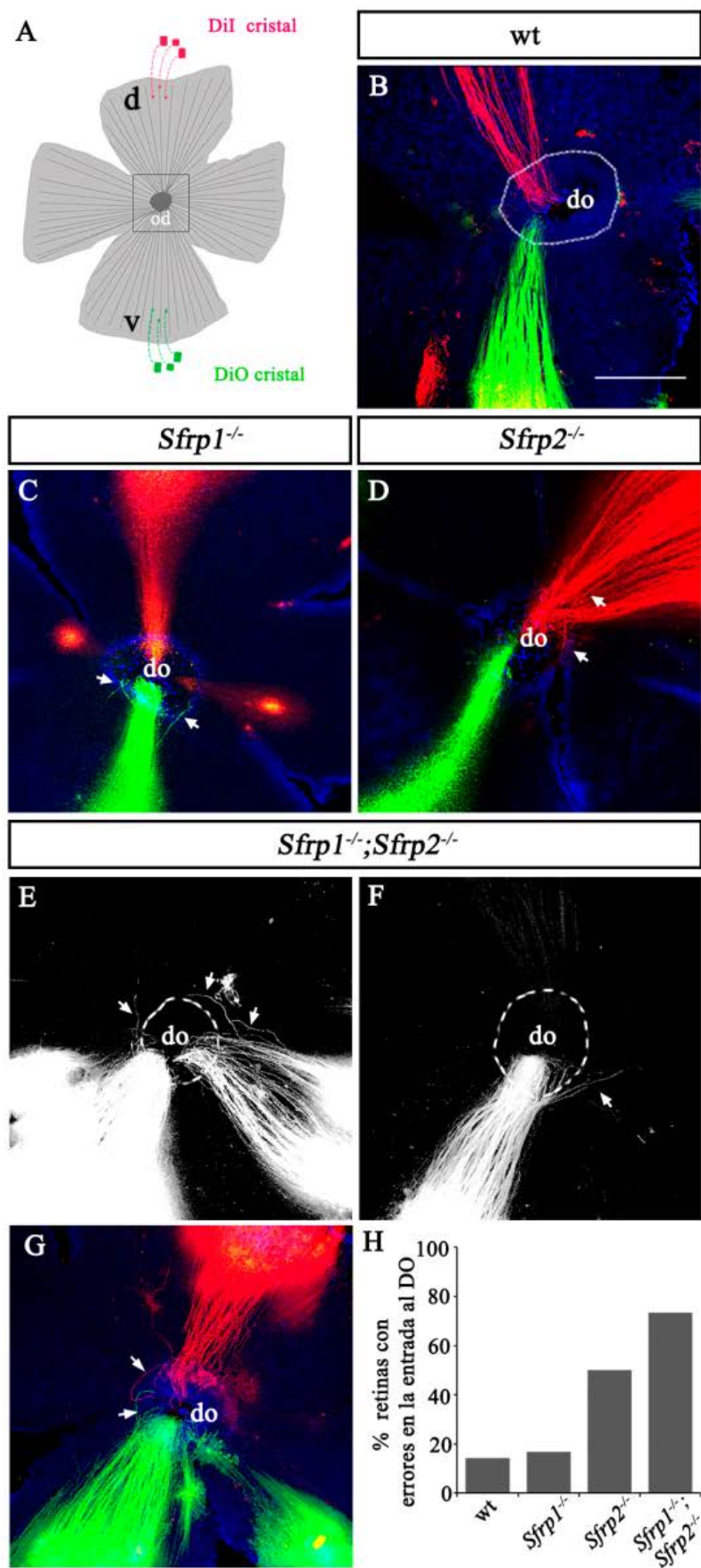


Figura18. Una proporción de los axones de las CGR fallan al entrar en el DO en ausencia de *sfrp2*. **A)** Esquema del método usado para trazar las retinas mediante cristales de DiI (rojo) en la región dorsal y de cristales DiO (verde) en la región ventral. **B-G)** Imágenes de preparaciones de retinas en plano de embriones E15.5 wt (**B**), *Sfrp1*^{-/-} (**C**), *Sfrp2*^{-/-} (**D**), *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**E-G**). Las líneas discontinuas marcan la posición del DO. Observe como las fibras se extienden a través del DO (**B**), mientras que en los mutantes algunas fibras fallan en la entrada al DO (**C-G**, flechas). Porcentaje de retinas que presentan axones con fallos en su entrada al DO en wt (n=14), *Sfrp1*^{-/-} (n=36), *Sfrp2*^{-/-} (n=20), y *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (n=30). Barra de escala 200µm. Imágenes cortesía de la Dra. Marcos.

Estos resultados indican que *Sfrp1* y *Sfrp2* influyen en el crecimiento de los axones de las CGR dentro de la retina, previniendo que los axones invadan las capas profundas de la retina y fomentando su entrada en el DO.

4.2.3 Los Sfrps son necesarios para el correcto crecimiento de los axones de las CGR a nivel de quiasma y tracto óptico.

Una vez los axones abandonan la retina a través del DO se extienden a través del nervio óptico hasta el quiasma óptico. En ratón, a diferencia de pollo, *Sfrp1* y *Sfrp2* no se expresan en el diencefalo, pero se encuentran a lo largo de los axones, por esta razón investigamos esta parte de la vía visual en busca de defectos que muestren una función de los Sfrps en la guía de los axones de las CGR.

El trazado unilateral con cristales de Dil del nervio óptico en embriones E15.5 mostró un comportamiento normal de los axones a nivel de la línea media tanto en wt como en los mutantes simples *Sfrp1*^{-/-} o *Sfrp2*^{-/-} (Fig. 19A-C), observándose solo un ligero aumento de fibras invadiendo el nervio óptico contralateral en los mutantes simples con respecto al wt. Sin embargo, en los embriones *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} se observó al final del nervio óptico un aumento significativo del número de axones desfasciculados prematuramente, los cuales entraban al QO en forma de bucle (Fig. 19 A-D). Estos defectos fueron más evidentes en el doble mutante *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}, presentándose una dispersión de los axones en el eje antero-posterior en aproximadamente un 80% de los embriones (n=23) (Fig. 19D). En el restante 20%, el quiasma presenta un fenotipo similar al descrito para los embriones de los mutantes *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} o *Robo2*^{-/-} (Plachez et al., 2008; Plump et al., 2002). En algunos casos se observó como algunas fibras desfasciculadas cruzan la línea media rostralmente al quiasma, llegándose a formar en ocasiones un fascículo adicional y a veces tomando rutas aberrantes hacia estructuras rostrales (Fig. 19E). En los fenotipos más extremos, las fibras presentan una distribución equitativa entre los tractos ópticos contralateral e ipsilateral (Fig. 19F). Los trazados de Dil de los diferentes genotipos a E13.5, periodo en el cual los primeros axones de las CGR llegan al QO, mostraron una menor dispersión anterior de los axones en los quiasmas de los embriones *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} que a estadios posteriores, y una organización similar en los axones de los embriones wt, *Sfrp1*^{-/-} y *Sfrp2*^{-/-} (Fig. 19G). Esto indica que los axones de las CGR tardías son más dependientes del efecto de los Sfrps sobre la fasciculación/guía que los axones pioneros.

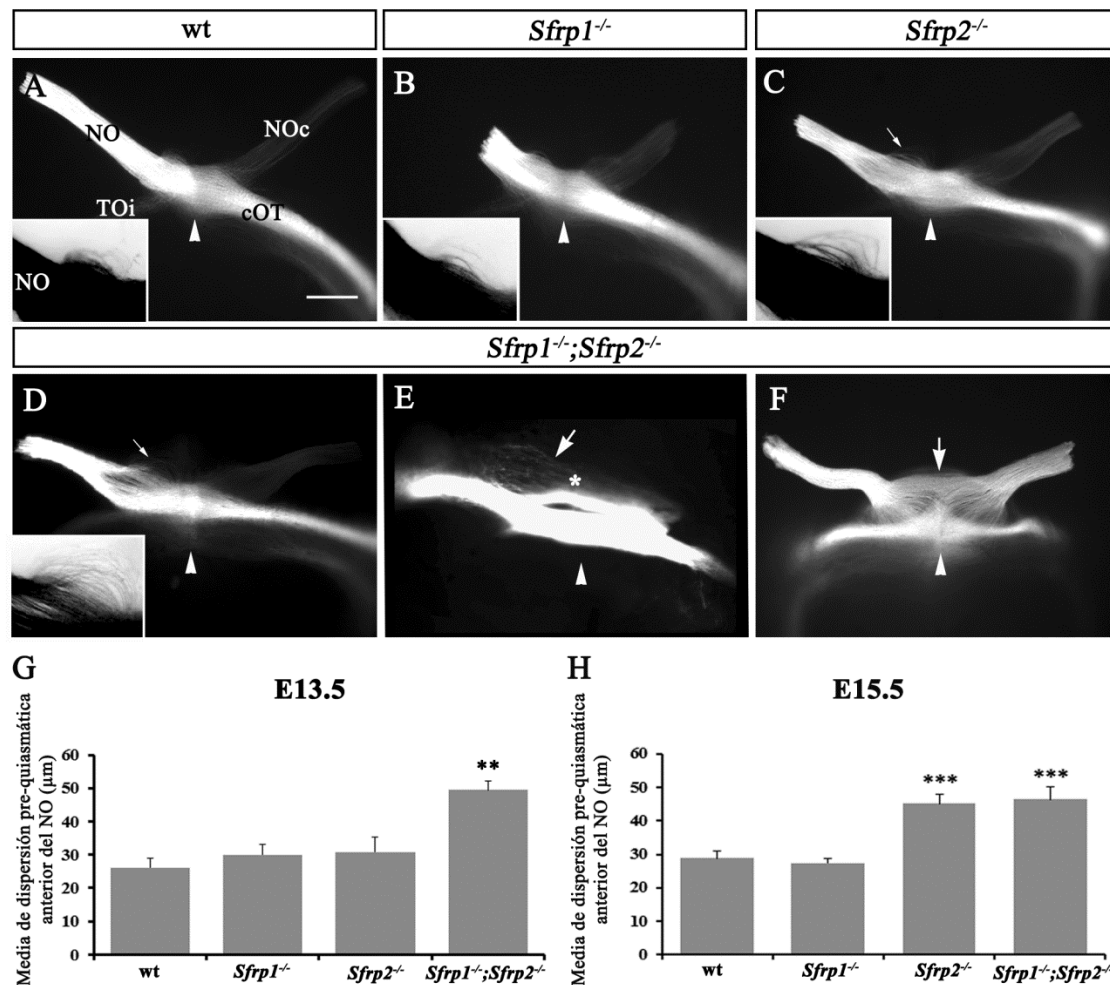


Figura 19. Sfrp es requerido para el correcto crecimiento de los axones de las CGR a nivel de QO. **A-F)** Visión ventral *in toto* de cerebros de embriones E15.5 wt (**A**), *Sfrp1*^{-/-} (**B**), *Sfrp2*^{-/-} (**C**), y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (**D-F**). Los embriones fueron trazados desde la retina derecha introduciendo un cristal de Dil en el DO. Las puntas de flechas indican la situación de la línea media. En **A-D** se tomó un detalle con contraste invertido a alto aumento de la región pre-quiasmática anterior. **A,B)** En los embriones wt y *Sfrp1*^{-/-}, los axones de las CGR se extienden dentro del NO en fascículos compactos y ligeramente desfasciculados cuando entran en el QO. La mayoría de los axones entran en el TOc, mientras una pequeña porción de axones se dirigen al TOi o entran en el el NOc. La entrada de los axones al QO aparece más desfasciculada en los embriones *Sfrp2*^{-/-} (**C**) y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (**D-E**, flechas). **F)** En casos extremos las fibras aparecen totalmente desfasciculadas, dividiéndose equivalentemente entre el TOc y el TOi, con múltiples axones entrando en el NOc. **G,H)** los diagramas representan la dispersión media de las fibras en la región pre-quiasmática anterior a E13.5 (**G**) y E15.5 (**H**), **p<0.01, ***p<0.001 (t-Student). Barra de escala 200μm.

Una vez los axones han cruzado la línea media, las fibras de las CGR wt se dirigen a través del tracto en un haz fasciculado, abriéndose en abanico cuando llegan al NGL (Fig. 20A). En los cerebros de *Sfrp1*^{-/-} y, más evidentemente, en los de *Sfrp2*^{-/-} esta apertura en abanico fue prematura y su tamaño fue significativamente acentuado (Fig. 20A-C, E-G, I). Además, algunas fibras se extienden aberrantemente a lo largo del diencefalo dorsal (Fig. 20E-G, I), como también ocurre en el mutante de *Robo2*^{-/-} (Plachez et al., 2008). El crecimiento aberrante a lo largo del diencefalo dorsal fue más

evidente en el mutante compuesto, tal vez debido a que el tracto óptico es más estrecho que el del wt (Fig. 20D, H-J).

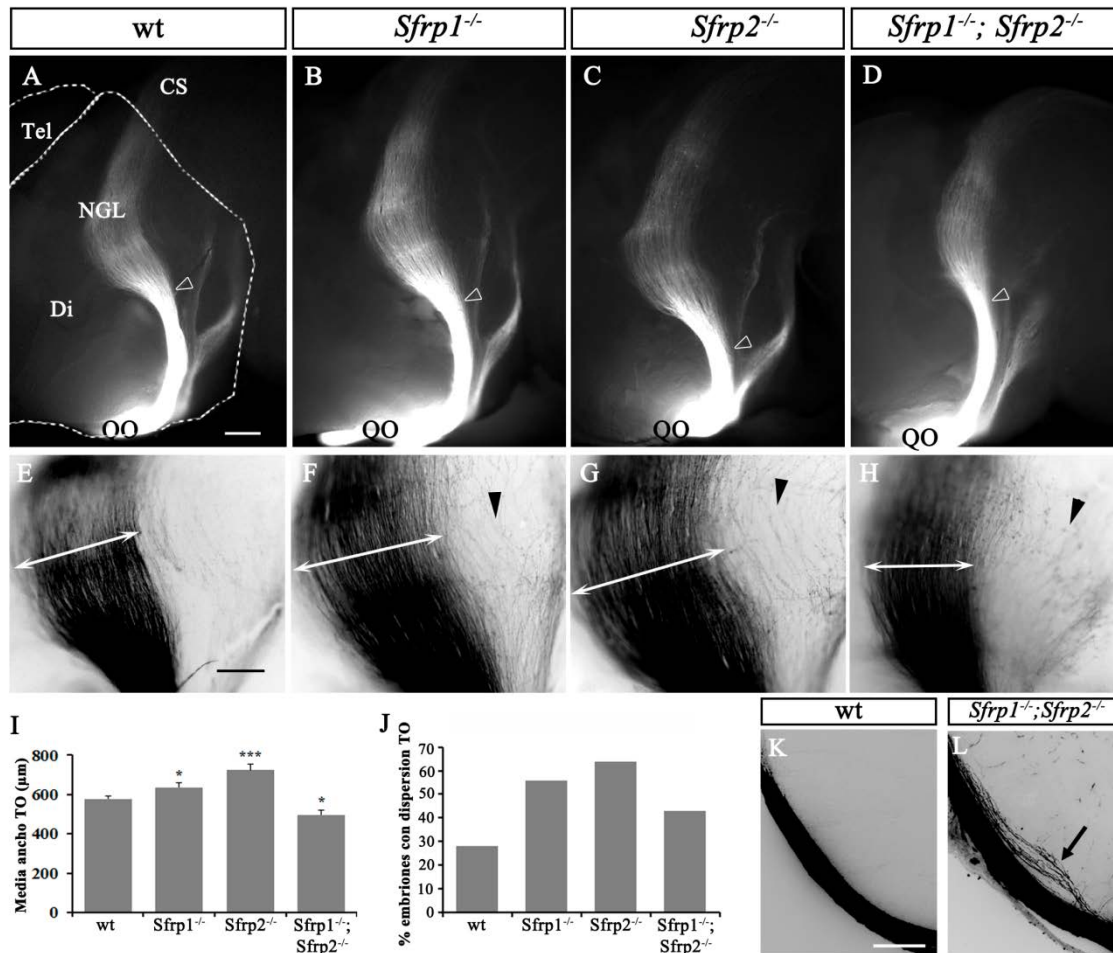


Figura 20. Deficiencias en *Sfrp* causa una desfasciculación prematura de los axones de las CGR a nivel de TO.

A-H) Visión lateral de los axones de las CGR trazados con Dil en embriones E15.5 wt (**A, E**), *Sfrp1*^{-/-} (**B, F**), *Sfrp2*^{-/-} (**C, G**), y *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**D, H**), los telencéfalos fueron retirados para poder observar el trayecto de las fibras en el TO. Las cabezas de flechas indican el lugar en el cual los axones comienzan a desfascicular y proyectan en el NGL (**A-D**). Imágenes con contraste invertido para observar la dispersión de las fibras (**E-H**, cabeza de flechas) y medir la anchura de las fibras que proyectan al NGL (**E-H**, doble flecha). **I)** El diagrama representa el ancho de las fibras del TO a nivel de NGL en embriones wt (n=11), *Sfrp1*^{-/-} (n=11), *Sfrp2*^{-/-} (n=10), y *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (n=11), *p<0.05, ***p<0.001 (t-Student). **J)** El diagrama representa el porcentaje de embriones que presentan dispersión de fibras a nivel de NGL. **K, L)** Imágenes de fluorescencia invertidas de secciones frontales del TO en embriones E15.5 wt (**K**) o *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**L**) trazados unilateralmente con un cristal de Dil situado en el DO para visualizar las fibras, obsérvese la dispersión de las fibras en el doble mutante (**L**, flecha). Barra de escalas 100μm (**E-H**), 150μm (**A-D**), 200μm (**K, L**).

Las diferencias en el grosor del tracto óptico podrían deberse a una desfasciculación medio-lateral, la cual es más evidente en las secciones de cerebro (Fig. 20K, L). También, podría en parte reflejar el acortamiento del eje antero-posterior característico en el doble mutante pero no en los mutantes simples de *Sfrp* (Sato et al., 2006). Cabe destacar que el sitio de la desfasciculación aberrante del tracto óptico

en los mutantes es el mismo en los embriones con el mismo genotipo, pero distinto entre los tres genotipos (Fig. 20A-D), sugiriendo que se debe a un comportamiento intrínseco de las CGR y no a una señal presente en el tejido circundante al tracto.

4.2.4 Los Sfrps influyen en la fasciculación de los axones de las CGR durante su crecimiento mediante un mecanismo dependiente de ADAM10.

Los datos obtenidos demuestran que los Sfrps contribuyen a la correcta guía de los axones de las CGR de la periferia de la retina, tanto dentro de la retina como en su crecimiento a lo largo la vía visual. Además, Sfrp1 ha sido descrito como modulador en el crecimiento de los axones en ratón (Sebastian-Serrano et al., 2012) y como molécula capaz de reorientar la extensión de los conos de crecimiento de las CGR en pollo y *Xenopus* (Rodríguez et al., 2005). Por tanto, *Sfrp1* y *Sfrp2*, expresados en la retina y enriquecidos en el DO (Fig. 17), podrían actuar como señales de guía, en combinación quizás con moléculas de la matriz extracelular en ratón. Sin embargo, el hecho de que existan defectos en la vía visual en los cuales no hay una expresión local de *Sfrp*, junto con la localización de Sfrp a lo largo de los axones de las CGR, parecen indicar un mecanismo autónomo de las CGR que explique los fenotipos observados en los mutantes.

Sfrp1 y Sfrp2 han sido descritos como inhibidores de la señalización de Wnt, influyendo en la expresión de genes diana de la vía de Wnt (Bovolenta et al., 2008). Consideramos, por tanto, la posibilidad de que la ausencia de *Sfrp1* y/o *Sfrp2* pudiera estar alterando la expresión de moléculas de guía axonal. En efecto, los defectos en la guía de los axones dentro de la retina han sido observados en ratones deficientes por ejemplo en *EphB2*, *EphB3*, *Slit1/2*, *Robo*, *BmpR1b* y *Netrina1* (Birgbauer et al., 2000; Deiner et al., 1997; Liu et al., 2003b; Plachez et al., 2008; Thompson et al., 2009; Thompson et al., 2006b), o cuando se interfiere con la señalización de Shh derivada de las CGR (Dakubo, 2003; Kolpak et al., 2005; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Sin embargo, el análisis de expresión, realizado por la Dra. Marcos, de *Netrina*, *Shh*, *EphB2*, *Slit1*, *Slit2* y *Robo2* no presentan cambios significativos en la retina de los mutantes simples o doble mutante, sugiriendo que los fenotipos observados no se deben a la anormal transcripción de estos genes (Fig. 21)

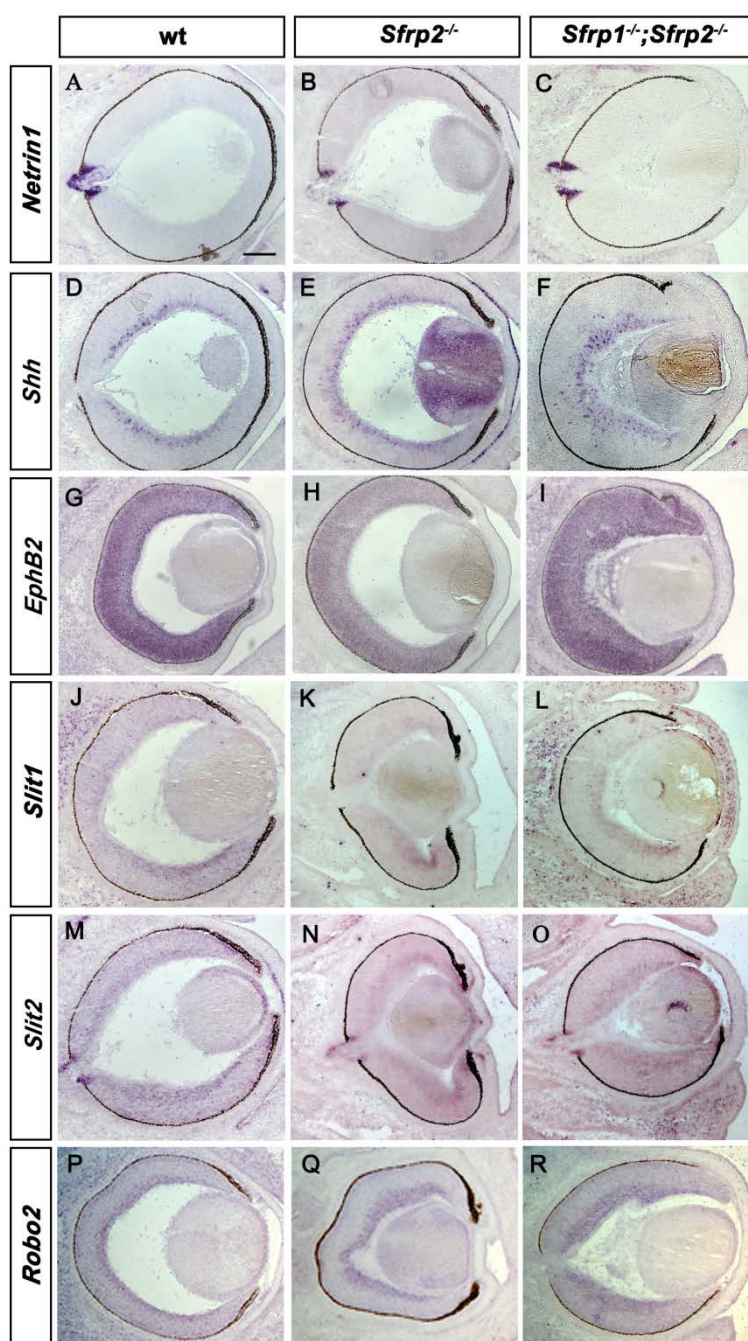


Figura 21. Deficiencias en *Sfrp* no altera la expresión de moléculas de guía axonal.

A-R) Secciones de criostato frontales de retina de embriones a estadio E14.5 wt (**A, D, G, J, M, P**), *Sfrp2*^{-/-} (**B, E, H, K, N, Q**) o *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (**C, F, I, L, O, R**) hibridadas con sondas *Netrina1* (**A-C**), *Shh* (**D-F**), *EphB2* (**G-H**), *Slit1* (**J-L**), *Slit2* (**M-O**) o *Robo2* (**P-R**). Nótese, que la expresión en los diferentes mutantes de estas moléculas implicadas en guía axonal no presentan cambios. Imágenes cortesía de la Dra. Marcos.

Nuestro laboratorio ha mostrado que los Sfrps actúan como moduladores negativos de ADAM10 en la retina. En este sentido se ha visto un aumento en la proteólisis de sustratos de ADAM10, como son Notch, APP, L1 y N-caderina, en los ratones *Sfrp1*^{-/-} (Esteve et al., 2011a). La expresión de Adam10 se localiza tanto en wt como en los mutantes a E15.5 en todo el neuroepitelio de la retina (experimentos realizados por Dña. A. Sandonís), siendo su expresión mayor en las CGR (Fig. 22A-C). Por tanto, las moléculas de Sfrp presentes en los axones de las CGR podrían controlar de manera autónoma la actividad de ADAM10, el cual podría regular a su vez moléculas involucradas en el propio crecimiento de los axones. Si esta hipótesis fuera

así, el crecimiento de los axones de las CGR en los explantes de retina wt comparado con la de los mutantes debería ser diferente. Para comprobar esta posibilidad, comparamos el crecimiento de las neuritas de explantes provenientes de embriones E15.5 wt, *Sfrp1*^{-/-}, *Sfrp2*^{-/-} o *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}.

El análisis de los explantes mostró un crecimiento diferente entre los explantes de los varios genotipos. Los explantes wt mostraron un crecimiento de las neuritas en pequeños haces de axones, mientras que los explantes de las retinas de embriones *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} presentaron un aspecto desfasciculado (Fig. 22D-F). El análisis del crecimiento de las neuritas mediante microscopía confocal de alto aumento confirmó la fasciculación de los axones wt, por el contrario el crecimiento de los axones de los mutantes *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} presentó una apariencia desfasciculada (Fig. 22G-I). Este crecimiento desfasciculado de los axones de los mutantes fue revertido mediante la incubación con proteína Sfrp1. Para poder cuantificar este comportamiento nos centramos en el análisis de los explantes de *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}, los cuales presentaban un fenotipo más evidente. El ancho medio de los fascículos formados por los axones en los explantes de retina de wt y doble nulos, confirmaron que los axones de *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} presentan fascículos más finos que los de wt ($22,56 \pm 4$ vs $34,4 \pm 5,6$ pixeles, $p=0,042$; Fig. 22P). La adición de proteína Sfrp1 al medio de cultivo tuvo un leve efecto sobre la fasciculación de los axones wt, pero generó un incremento significativo del ancho de los fascículos en los explantes de retinas *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} ($30,4 \pm 2,63$ vs $22,56 \pm 4$ pixeles, $p=0,015$), llegando a un valor cercano al de los explantes wt sin Sfrp1 ($p=0,049$, Fig. 22P). Además, la proporción de fascículos que presentan un ancho mayor de 60 pixeles fue 3 veces menor en los explantes de retina *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} que el observado en los axones wt (5,8% y 14,3% respectivamente), pero la adición de la proteína Sfrp1 al medio de cultivo hizo que el porcentaje de fasciculación se igualara al observado en wt (14,37%, Fig. 22Q). Una tendencia similar fue observada con la adición del inhibidor específico de ADAM10 (GI254023X) al medio de cultivo (Fig. 22M-O). Los explantes de retinas wt presentan también una mayor fasciculación de sus axones que los explantes de retinas *Sfrp2*^{-/-} (Fig. 22R), la adición del inhibidor de ADAM10 provocó un aumento de la fasciculación de los axones de *Sfrp2*^{-/-} con respecto a los no tratados llegando a equipararse el tamaño de los fascículos a los del wt ($20,10 \pm 1,10$ vs $21,95 \pm 1,82$ pixeles, $p=0,54$), incrementándose la proporción en el tamaño de los fascículos a valores similares al wt (Fig. 22S).

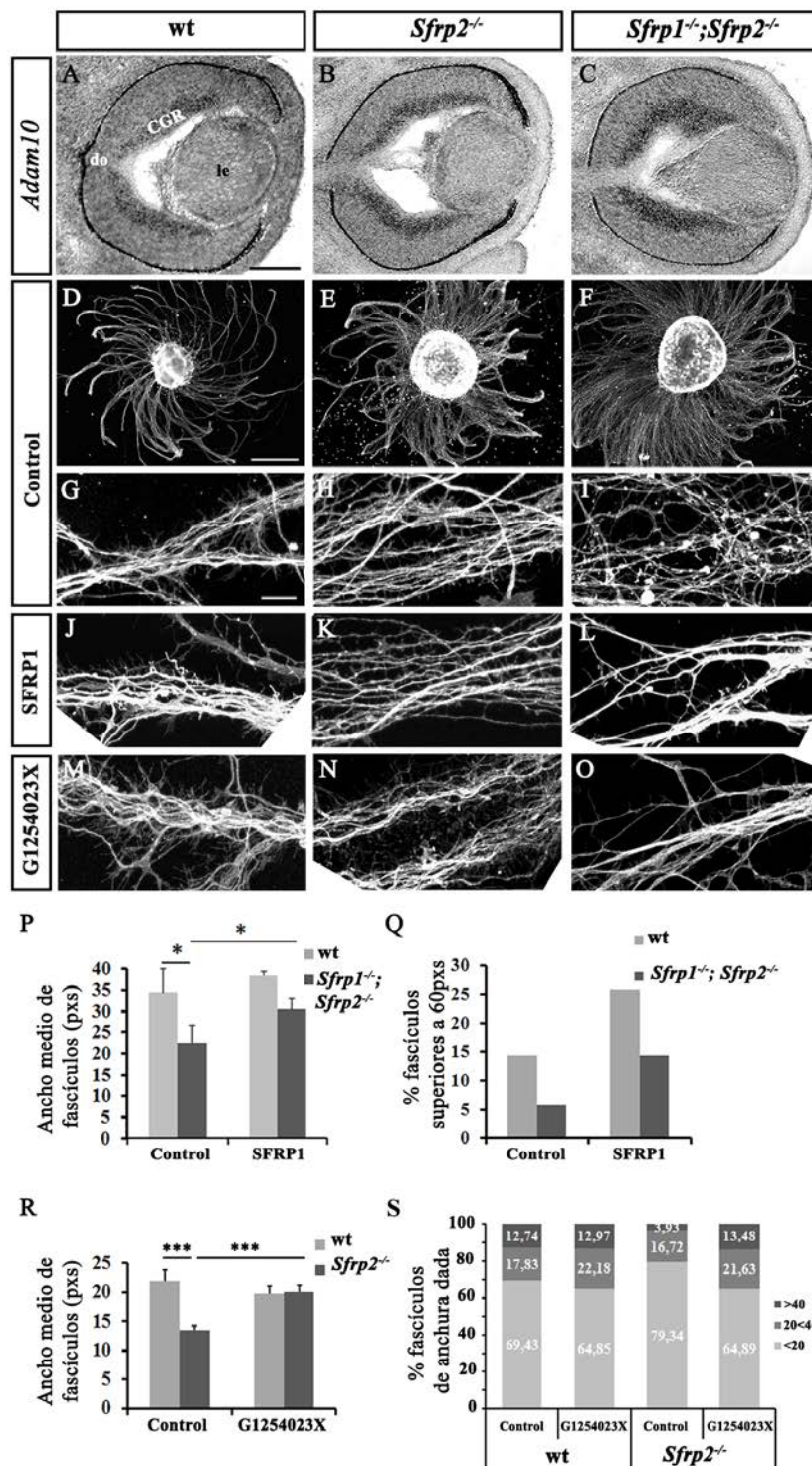


Figura 22. La fasciculación en el crecimiento de las neuritas requiere la modulación de la actividad de ADAM mediada por Sfrp.

A-C) secciones frontales de retina de embriones E15.5 wt (**A**), *Sfrp2^{-/-}* (**B**), y *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}* (**C**) hibridadas con la sonda *Adam10*, imágenes cortesía de Dña A. Sandonís. Obsérvese que *Adam10* se expresa en las CGR de todos los embriones (**A-C**). Visión a bajo aumento (**D-F**) y alto aumento (**G-O**) de explantes de retina de embriones E15.5 wt (**D, G, J, M**), *Sfrp2^{-/-}* (**E, H, K, N**), y *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}* (**F, I, L, O**), tratados CON proteína SFRP1 (**J, K, L**) o el inhibidor de Adam10 (G1254023X) (**M, N, O**). **P**) El digrama representa la anchura media de los fascículos de explantes wt y *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}* en ausencia o presencia de la proteína SFRP1 en el medio, * $p < 0.05$ con respecto al wt y al control (t-Student). **Q**) El grafico representa el porcentaje de fascículos más anchos de 60pxs en wt y *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*. **R**, grafico de la media del ancho de los fascículos de las neuritas en explantes wt y *Sfrp2^{-/-}* tratados con G1254023X o controles con DMSO, *** $p < 0.001$ con respecto al wt y al control (t-Student). **S**, el grafico representa el porcentaje de fascículos de anchura determinada de explantes wt y *Sfrp2^{-/-}* tratados con G1254023X o con DMSO.

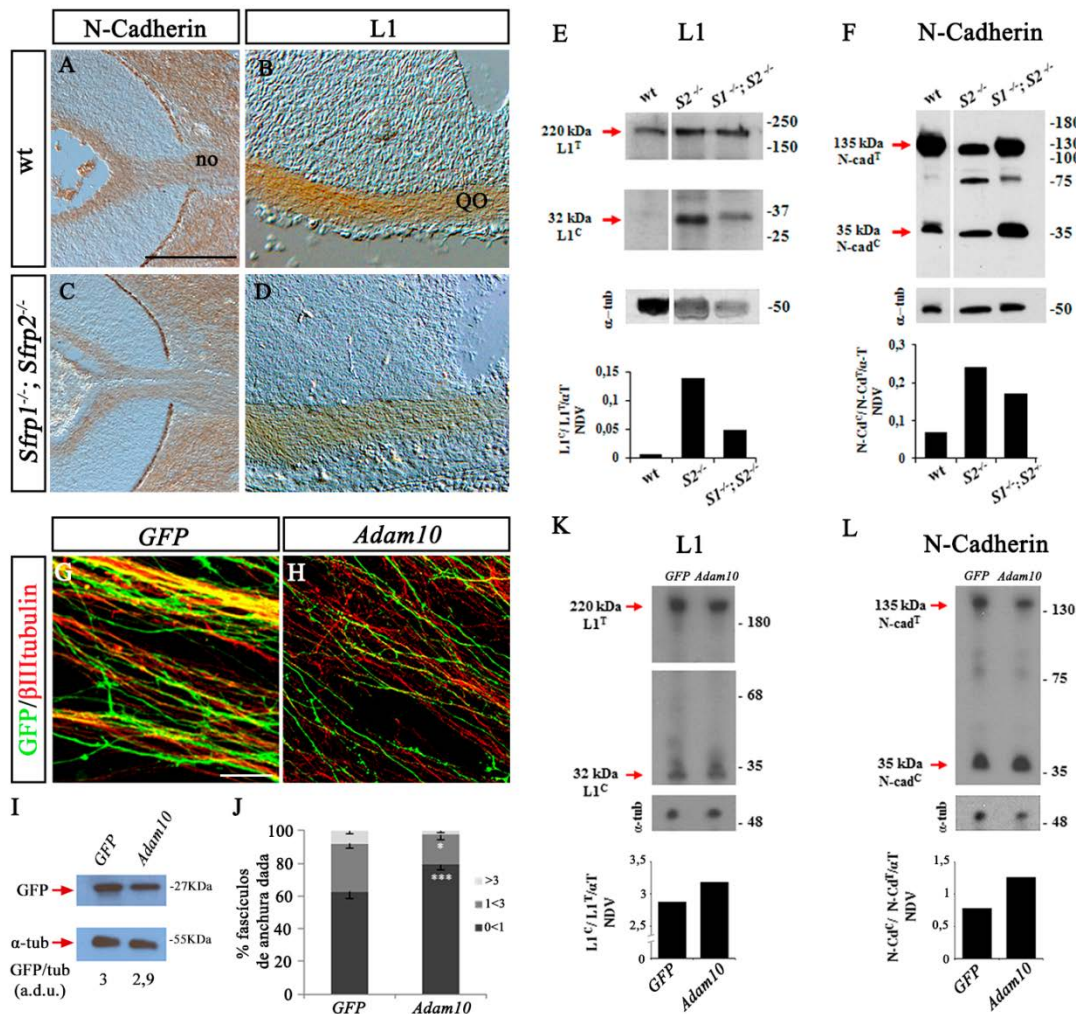


Figura 23. ADAM10 media la desfasciculación de los axones de las CGR regulando la proteólisis de L1 y N-caderina.

A-D) Secciones transversales de embriones E15.5 wt (**A, B**) y *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**C-D**) a nivel de ojo (**A, C**) y de QO (**B, D**). Las secciones fueron inmunoteñidas con anticuerpos α -N-caderina (**A, C**) y α -L1 (**B, D**). **E, F)** Análisis mediante western blot de L1 (**E**) y N-caderina (**F**) en lisados de la vía visual próxima de embriones E16.5 wt, *Sfrp2*^{-/-}, y *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-}. Los fragmentos de L1 de 32 kDa y de N-caderina de 35 kDa están incrementadas en los lisados *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-}, como se observa en el gráfico del procesado y no procesado normalizado a la banda de α -tubulina como control de carga (**E, F**). **G, H)** Imagen confocal de explantes procedentes de retinas electroporadas *ex utero* con plásmidos *GFP* (**G**) o *GFP* y *Adam10* (**H**), inmunoteñidos con α -GFP (verde) o α - β III-tubulina (rojo). **I)** Western blot demostrando una similar electroporación en los explantes *GFP* y los *GFP* y *Adam10*. Los niveles de *GFP* se normalizaron con α -tubulina. **J)** Porcentaje de fascículos de neuritas con medidas determinadas, en explantes electroporados con *GFP* o *GFP* y *Adam10*. ADAM10 reduce significativamente el número de fascículos anchos, **p*<0.05, ****p*<0.001 con respecto a *GFP* (test de Bonferroni). **K, L)** Análisis mediante western blot de L1 (**K**) y N-caderina (**L**) de lisados procedentes de explantes electroporados con *GFP* o con *GFP* y *ADAM10*. Obsérvese un incremento en el ratio de procesado/no procesado de N-caderina y L1 normalizado a α -tubulina en los explantes con sobreexpresión de *ADAM10*. Barra de escala 200 μ m (**A-D**), 10 μ m (**G-H**). **A-F)** Imágenes cedidas por Dña. A. Sandois.

Los datos obtenidos en estos análisis sugieren que *Sfrp* estaría favoreciendo el crecimiento fasciculado de los axones de las CGR mediante un mecanismo que implica a ADAM10. Estudios recientes han descrito como el homólogo en *Drosophila* de ADAM10, denominado Kuzbanian, está involucrado en la activación del receptor Robo (Coleman et al., 2010). Además *Sfrp1* interfiere con Kuzbanian (Esteve et al.,

2011a) y hay una cierta similitud de los fenotipos de *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} con los mutantes Robo2/Slit (Plump et al., 2002; Thompson et al., 2009; Thompson et al., 2006a). Por ello, consideramos la posibilidad que ADAM10 esté procesando a Robo, y que dicho procesamiento se vea incrementado en la ausencia de *Sfrp*. Sin embargo, estudios de sobreexpresión de *Robo2* y *Adam10* en células o la extracción de lisados de la vía visual de embriones wt comparados con embriones *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}, realizados por Dña A. Sardonís, no revelaron cambios significativos en el procesamiento de Robo2 por ADAM10 en los análisis de Western blot.

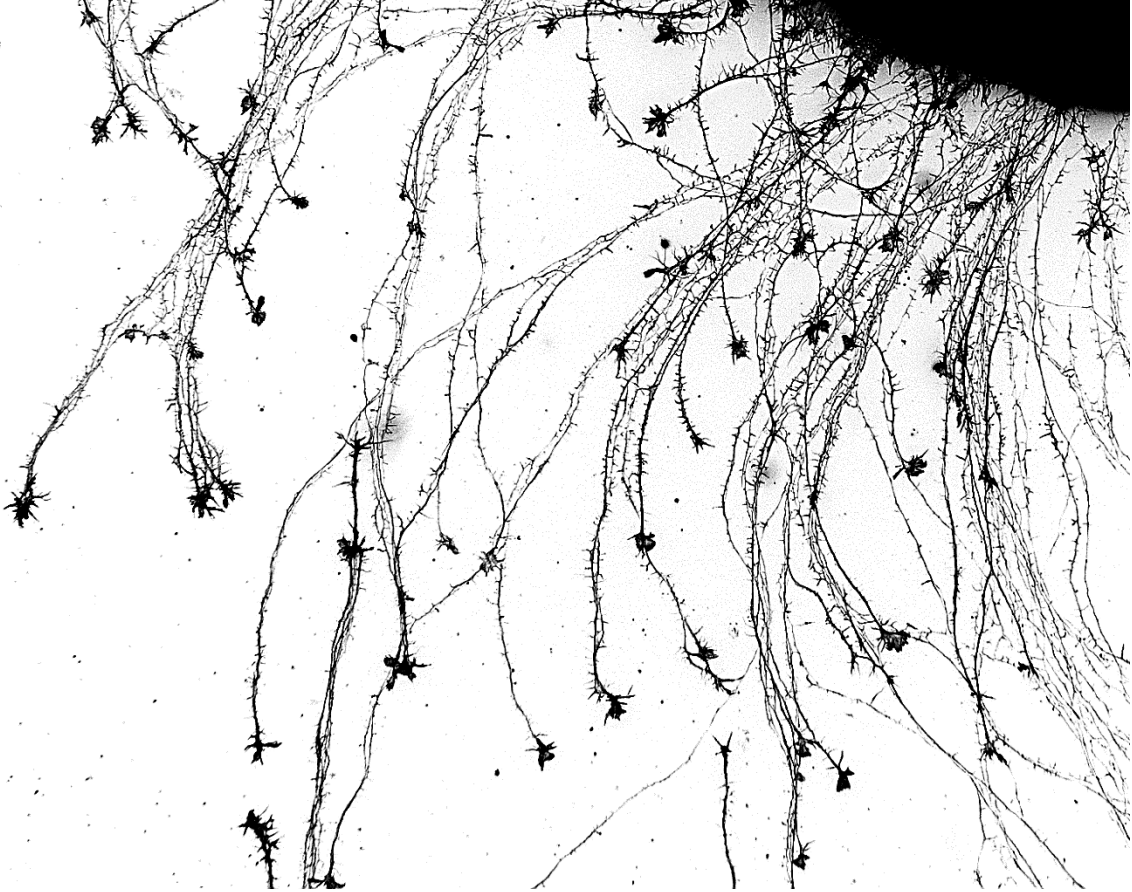
El procesamiento de Robo por ADAM10 no parecía ser el mecanismo por el cual se explica el fenotipo de los mutantes de *Sfrp*. Por ello, decidimos explorar si substratos específicos de ADAM10 implicados en la fasciculación de los axones de las CGR, como son N-caderina o L1 (Lyckman et al., 2000; Masai et al., 2003; Mi et al., 1998; Reiss et al., 2005; Riedle et al., 2009; Riehl et al., 1996), presentan un procesamiento proteolítico anormal en la retina de los embriones *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (Esteve et al., 2011a).

L1 y N-caderina son moléculas fuertemente presentes en los axones de las CGR a E15.5, tanto en los embriones wt como en los *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (Fig. 23A-D), además su procesamiento anormal podría explicar tanto los fenotipos observados *in vivo* como los *in vitro* en los ratones mutantes de *Sfrp*. ADAM10 proteoliza el dominio extracelular de N-caderina y L1, siendo este procesamiento necesario para la proteólisis por parte de una α -secretasa, la cual genera un péptido intracelular de 35kDa para N-caderina y uno de 28kDa para L1 (Reiss et al., 2005; Riedle et al., 2009). El análisis del lisado del tejido de la vía visual, comprendido entre la retina y el NGL, de embriones E16.5 wt, *Sfrp2*^{-/-} y *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} mediante Western blot, realizado por Dña. A. Sardonís, reveló un incremento de la proteólisis tanto de N-caderina como de L1 en los mutantes con respecto al wt (Fig. 23E,F). Por tanto, como se había visto anteriormente (Esteve et al., 2011a), la inactivación de *Sfrp* parece incrementar la actividad de ADAM10, lo cual podría ser el responsable del crecimiento desfasciculado de los axones de las CGR en los mutantes *Sfrp*. Si este fuese el caso, la sobreexpresión de *ADAM10* en explantes de retina debería de mimetizar el fenotipo observado en los mutantes *Sfrp*. En efecto, la electroporación ex utero de retinas de embriones wt con plásmidos *GFP* más *ADAM10* mostraron un crecimiento de los axones GFP positivos individualizado o formando fascículos muy finos, en cambio los axones controles que solo presentaban *GFP* formaron fascículos más anchos (Fig. 23G-J). Este comportamiento fue asociado con un incremento en la proteólisis de N-caderina y L1 en los explantes en los cuales *ADAM10* estaba sobreexpresado con

respecto a sus controles (Fig. 23K, L). Aunque este aumento en los explantes electroporados fue menos pronunciado que en los mutantes de *Sfrp* (Fig. 23E,F) debido a que solamente una porción de las CGR fueron electroporadas.

Los resultados en su conjunto apuntan a la posibilidad de que los defectos de desfasciculación observados en la ausencia de *Sfrp1/2* son consecuencia de una anormal procesamiento mediado por ADAM10 de al menos N-caderina.

Discusión



Durante la neurogénesis de la retina, los progenitores neurales van a dar lugar a diversos tipos neuronales entre los que se encuentran las CGR (Cepko, 2014). Durante el proceso de diferenciación, se van a producir diversos tipos de CGR atendiendo a sus características fisiológicas, morfológicas y moleculares. Durante dicho proceso de diferenciación, las CGR expresan una serie de genes que van a determinar su identidad neuronal, la cual determinará una función específica para cada tipo de CGR (Sanes and Masland, 2015).

Una vez la CGR se ha diferenciado y adquirido una identidad neuronal, su axón crece a lo largo de la vía visual para proyectar en regiones concretas del cerebro. La guía de los axones a través del sistema visual dependerá no solo de las señales que el cono de crecimiento se encuentre en este trayecto, sino de cómo el cono de crecimiento interprete esas señales. Esta interpretación depende en gran medida del tipo de receptores que presente el cono de crecimiento en su membrana, por lo que la regulación de la expresión génica de estos receptores es clave en la guía de los axones. La identidad que adquiera la CGR puede permitir la expresión de unos receptores u otros, haciendo que el axón de la CGR sea guiado a su célula diana de manera precisa, y generando una circuitería más compleja entre la retina y el cerebro (Erskine and Herrera, 2007, 2014).

Aunque existan mecanismos de guía axonal propios de algunos tipos de CGR, existen otros mecanismos de guía axonal más generales que permiten la correcta guía de los axones a través del sistema visual. Los mecanismos de adhesión permiten la guía de los axones formando fascículos favoreciendo su correcto crecimiento a través de la vía visual (Bao, 2008; Van Vactor, 1998). Pero esta adhesión entre los axones debe romperse en el momento que los axones proyecten a diferentes regiones. Este proceso de interrupción de la adhesión podría estar mediado por metaloproteasas.

Hemos analizado estos dos tipos de mecanismos, uno más específico en el cual observamos como Boc participa en conferir identidad ipsilateral a las CGR en la región VT de la retina. La adquisición de esta identidad repercute en el crecimiento de sus axones y su respuesta a la información presente en el entorno, llevando a una proyección correcta a los núcleos del cerebro. Por otro lado, hemos estudiado un mecanismo que implica la modulación de la metaloproteasa ADAM10 por parte de los Sfrps que controla los mecanismos de desfasciculación/fasciculación. Este proceso es de gran importancia para la correcta proyección de los axones de las CGR a las diferentes regiones del cerebro.

Discusión

Como ya hemos visto, las CGR son las primeras neuronas en diferenciarse en la retina (Cepko, 2014; Cepko et al., 1996) y en esta generación tiene un papel clave la señalización de Shh (Esteve and Bovolenta, 2006). Pero Shh no solo está implicado en la proliferación y diferenciación de la retina, sino que trabajos previos de nuestro laboratorio han demostrado que Shh es necesario para la guía de los axones, mediante un mecanismo autónomo y no autónomo (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Si atendemos al tipo de proyección de las CGR, observamos que el papel de Shh en guía axonal afecta a las CGR que proyectan contralateralmente, en ratón la inmensa mayoría. Sin embargo poco es sabido del papel que tiene Shh en la diferenciación y la guía de los axones de un pequeño grupo de CGR situadas en la región VT, las cuales van proyectar ipsilateralmente. Estas CGR_i se caracterizan por la expresión de *Zic2*, el cual inicia un programa ipsilateral que activa la expresión de efectores de ipsilateralidad como son el receptor de efrina *EphB1* o el transportador de serotonina (*Sert*) (Garcia-Frigola et al., 2008; Lee et al., 2008). Las CGR_i, a diferencia del resto de CGR, carecen de la expresión de *Shh* pero presentan la expresión de su receptor *Boc* (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Boc ha sido ya implicado en la modulación de la señalización de Shh, y se ha demostrado que contribuye en la especificación neuronal en el tubo neural del pez cebra (Bergeron et al., 2011). Aunque ya ha sido descrita la existencia de un bucle regulatorio entre *Zic2* y la señalización de Shh (Sanek et al., 2009), hasta ahora no se sabía si esta regulación existía en la región VT de la retina. Además, la expresión en la región VT de la retina de *Islet2* limita fuertemente la expresión de *Zic2*, ya que se ha visto como la inactivación génica de *Islet2* permite una expansión de la expresión de *Zic2* en la región VT (Pak et al., 2004). Los estudios con el ratón nulo de Boc, nos han permitido encontrar un bucle de regulación entre *Zic2* y la señalización de Shh mediada por Boc. Esta regulación promueve la generación de un correcto número de CGR *Islet2/Zic2* positivas en la región VT.

La observación del ratón *Boc*^{-/-}, mostró una reducción en la proyección ipsilateral, sin presentar una disminución en el número de CGR en la región VT. Estudios previos de Fabre et al. (2010) habían mostrado que Boc participaba en la guía de los axones de las CGR_i mediante una señal de repulsión mediada por la secreción de Shh desde los bordes del quiasma, guiando al cono de crecimiento dentro del TOi. Para confirmar el papel de Boc en la guía de los axones de las CGR_i, como se había visto en los estudios de Fabre et al. (2010), durante esta tesis se realizaron ensayos de sobreexpresión ectópica de Boc en las CGR de la retina central mediante electroporación *in utero*. Al igual que lo descrito por Fabre et al., solo

obtuvimos un incremento muy modesto en el número de axones ipsilaterales ectópicos provenientes de la retina central. Esto no ocurrió con la sobreexpresión de *Zic2*, la cual generó un aumento muy significativo del número de ipsilaterales ectópicas. Con estas observaciones concluimos que *Boc* es necesario pero no suficiente para provocar ipsilateralidad y que son necesarios otros determinantes moleculares para dar identidad ipsilateral a estas CGR.

La disminución de la proyección ipsilateral en el mutante de *Boc* podría indicar un posible papel de este receptor en la guía de los axones como indicaba Fabre et al (2010) o un papel en la especificación de las CGRi. Por esta razón analizamos el número de células *Zic2* positivas en la región VT. Observamos una progresiva reducción de las células *Zic2* positivas en la región VT de los ratones mutantes de *Boc*. Aunque el número de células *Zic2* positivas es normal a estadios embrionarios, postnatalmente se ve reducido. Además, las células *Islet2* positivas se ven incrementadas, indicando un posible cambio en la identidad de parte de las CGR en la región VT. Este cambio de identidad podría verse reflejado en las proyecciones de las CGR al NGLd. Por ello se realizó un estudio retinotópico de los mutantes *Boc*. Este análisis mostró una reducción de la proyección ipsilateral junto con un aumento de la proyección contralateral tardía, siendo estas CGRc tardías generadas en la región VT de la retina.

Este cambio de identidad podría explicar la disminución de la proyección ipsilateral y el aumento de fibras en la región de la proyección contralateral tardía proveniente de la región VT. Algo similar ocurre en los ratones albinos (*Tyr^{c-2J/c-2J}*), los cuales presentan al igual que los mutantes *EphB1* y *Boc* una reducción en la proyección ipsilateral. El análisis de los ratones albinos muestra también una proyección retinogeniculada alterada al igual que los mutantes *Boc*, dicha proyección no parece estar alterada en los ratones mutantes de *EphB1* (Rebsam et al., 2009). Añadir también que a diferencia de los mutantes *EphB1* los cuales no presentan alteraciones en la expresión de *Zic2* (observaciones de la Dra E. Herrera), los ratones albinos presentan una reducción en la expresión de *Zic2* en la región VT al igual que los ratones *Boc^{-/-}*. Los ratones albinos no presentan un aumento de células con marcadores contralaterales (*Nr-CAM* y *Islet2*) en la región VT, cosa que si ocurre en el ratón *Boc^{-/-}*. La proyección retinogeniculada de los ratones albinos muestran parches de la proyección ipsilateral cercanos al lugar de proyección de las CGRc tardías, lo que nos indica que no llegan adquirir una completa identidad de CGRc tardías, suceso que si ocurre en los ratones *Boc^{-/-}*.

Discusión

Los ratones *Boc*^{-/-} presentan una mezcla de fibras contralaterales e ipsilaterales a nivel de NGLd. Este entrecruzamiento es más evidente en las regiones caudales y podría indicar una pérdida de la información de guía proveniente del QO, lo cual podría explicar el crecimiento lento de algunas fibras, ya que se observa una acumulación de conos de crecimiento a nivel de QO y de TOi. Además, explicaría la reducción en la invasión a nivel de NGLd a estadios tempranos. Otra posible explicación es que las fibras contralaterales ocupen el espacio dejado por la proyección ipsilateral a nivel dorso-central del NGLd en el ratón *Boc*^{-/-}.

Investigando la relación que podría existir entre *Boc* y *Zic2*, hemos mostrado que en los embriones mutantes hipomorfos *Zic2*^{kd/kd} y en los nulos de *FoxD1*, tanto la expresión de *Islet2* como la de *Shh* es incrementada en la región VT. Además estos mutantes presentan una ausencia o una drástica reducción en los niveles de expresión de *Boc* en la retina. Estas observaciones evidencian la existencia del bucle de regulación negativa entre *Zic2* y *Islet2* en la región VT propuesto por (Pak et al., 2004) e indican que *Boc* actúa bajo la regulación de *Zic2*. *Zic2*, es un miembro de la familia de los Gli, con una secuencia consenso de unión a ADN muy similar a la de los Gli (Aruga, 2004). Esta secuencia se encuentra en los posibles “*enhancers*” de regulación de *Boc* en diferentes especies de vertebrados, sugiriendo un posible papel directo de *Zic2* en la regulación de *Boc*.

Boc, aunque importante para la regulación del número de CGRi y CGRc, no es esencial para el comienzo de la expresión de *Zic2*, ya que, esta expresión comienza normalmente en los embriones *Boc*^{-/-}, pero es mantenida solo en un pequeño grupo de CGR. Este inicio normal en la expresión de *Zic2* entra en contradicción con la presencia de una proyección ipsilateral reducida a estadios más tempranos como es E16.5. Sin embargo, en ausencia de *Boc*, la expresión inicial de *Zic2* podría no alcanzar los niveles suficientes para desencadenar un comportamiento ipsilateral total y generar una normal velocidad de crecimiento de esa proyección, lo cual se observa con un aumento del número de conos de crecimiento a nivel de QO y de TO. Aunque no hayamos encontrado diferencias ni en proliferación ni en apoptosis entre los animales wt y los *Boc*^{-/-}, no podemos descartar que este crecimiento lento pudiera interferir con la proyección de los axones, lo cual finalmente desencadenaría la muerte de las CGRi, contribuyendo a la disminución en su número en la región VT.

Estudios en ratón y pez cebra han propuesto que la activación y mantenimiento de la expresión de *Zic2* es dependiente de la señalización de *Shh* (Brown et al., 2003; Hayhurst et al., 2008; Sanek et al., 2009). Sin embargo, *Zic2* se

expresa principalmente en la región dorsal del SNC de vertebrados, lugar donde la forma represora de los Gli es abundante (Stecca and Ruiz, 2010), sugiriendo que la expresión de *Zic2* requiere de bajos niveles de la señalización de Shh para su expresión. Tomando estas observaciones junto con los datos obtenidos en esta tesis, proponemos un modelo en el cual bajos niveles de Shh, provenientes de las CGRc que comienzan a diferenciarse, son necesarios para activar la expresión de *Zic2*; por el contrario altos niveles de Shh inhibirían la expresión de *Zic2*. El gradiente que se genera de Shh desde la región más central hacia la más periférica en el área VT de la retina, explicaría la expresión opuesta de *Zic2*, siendo esta mayor en la región más cercana a la zona del margen ciliar como se ha descrito previamente en embriones wt (Herrera et al., 2003; Tian et al., 2008). Proponemos que una vez activada la expresión de *Zic2* en la región VT, regularía entonces la expresión de *Boc*, el cual modularía la señalización de Shh en esta región de manera celular-autónoma, generándose un bucle de regulación entre la señalización de Shh y los factores de transcripción con homeodominio, similar al que ocurre en la generación del patrón ventral del tubo neural (Lek et al., 2010).

Boc, *Cdon* y sus ortólogos en *Drosophila* son capaces de unir Hh y modular el gradiente del ligando (Cardozo et al., 2014; Hartman et al., 2010). La ausencia de *Boc*, por tanto, podría permitir una mayor difusión de Shh en la región VT, como consecuencia de esto las CGR podrían estar recibiendo altos niveles de Shh, lo cual interferiría con la expresión de *Zic2*. Estas observaciones explicarían por qué en el mutante *Boc*^{-/-} se observa un pequeño grupo de células *Zic2* positivas contiguas a la ZMC, la cual es la más alejada de la fuente de Shh. En esta región más alejada, los niveles de Shh podrían ser lo suficientemente bajos como para permitir la expresión y mantenimiento de *Zic2*, el cual activaría el programa ipsilateral mediante la expresión de efectores como *EphB1* y *Sert*, los cuales establecerían una proyección ipsilateral parcial.

La regulación cruzada entre *Zic2* y la señalización de Shh también puede explicar lo que observamos cuando sobreexpresamos ectópicamente *Boc* y *Zic2* en las CGRc de la retina central (Fig. 10G). *Boc* expresado en las CGRc permitiría una acumulación de Shh en estas CGRc, aumentando así los niveles de la señalización de Shh en las CGRc, lo cual provocaría un aumento del efector de la vía de Shh, Gli1. Gli1 podría competir por los lugares de unión al ADN con *Zic2*, lo cual provocaría una disminución en los efectores de ipsilateralidad. Este suceso generaría una reducción en el número de fibras ipsilaterales ectópicas.

Discusión

La expresión espacio-temporal de los genes diana de la señalización de Shh son altamente dependientes de los niveles del morfógeno y de la duración a la cual las células receptoras se ven expuestas a él (Dessaud et al., 2007). Las células de la placa del suelo, como las CGRc, secretan y responden a Shh, formando un patrón neuronal gracias a la elevada y transitoria señalización de Shh (Ribes et al., 2010). En ausencia de *Boc*, el incremento de la difusión de Shh dentro de la región VT podría activar el programa contralateral en las CGR, incluyendo la expresión de *Islet2* y *Shh*, los cuales han sido implicados en la especificación y diferenciación de las CGRc (Esteve and Bovolenta, 2006). En este bucle de regulación, la señalización de Shh podría estar reprimiendo la expresión de *Zic2* como observamos en la disminución de *Zic2* cuando sobreexpresamos ectópicamente *Shh* en la región VT, al igual que ocurre con *Zic1* en pez cebra y pollo (Aruga et al., 2002; Klaus et al., 1999).

Los estudios con el triple mutante de *Boc*, *Cdon* y *Gas1* han demostrado una cierta redundancia de función entre los tres receptores de Shh (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011). La expresión de los tres receptores en la ZMC, pero no en la región VT, podría explicar el mantenimiento de la expresión de *Zic2* en el margen ciliar y la disminución de sus niveles en la región VT. La presencia de otros receptores podría explicar por qué la pérdida de CGRi es parcial en el mutante de *Boc*. Un posible ejemplo es *Lrp2* (también conocida como *Megalina*), el cual es un miembro de la familia de los receptores de lipoproteínas de baja densidad capaz de unir y acumular Shh (Christ et al., 2012; McCarthy et al., 2002).

Proponemos un modelo en el cual el correcto nivel de la señalización de Shh mediado por *Boc* coopera con *Zic2* en la especificación y conectividad de las CGRi (Fig. 24). En todos los vertebrados, las CGRc expresan Shh (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008), el cual influye en la neurogénesis de la retina de manera específica de especie (Esteve and Bovolenta, 2006; Zhang and Yang, 2001a, b). En ratón, la ausencia de Shh o la del componente esencial de la señalización de Shh, *Smoothed*, provoca un incremento en el número de CGR, sugiriendo que Shh limita la producción de CGRc (Sakagami et al., 2009; Wang et al., 2005). Por lo tanto, diferentes niveles de activación de la señalización de Shh, mediado por diferentes receptores, junto con la mutua represión entre *Zic2* e *Islet2*, deberían ser la base de la divergencia de las CGRi y las CGRc, y el consecuente establecimiento de unas correctas proyecciones a las dianas cerebrales (Fig. 24).

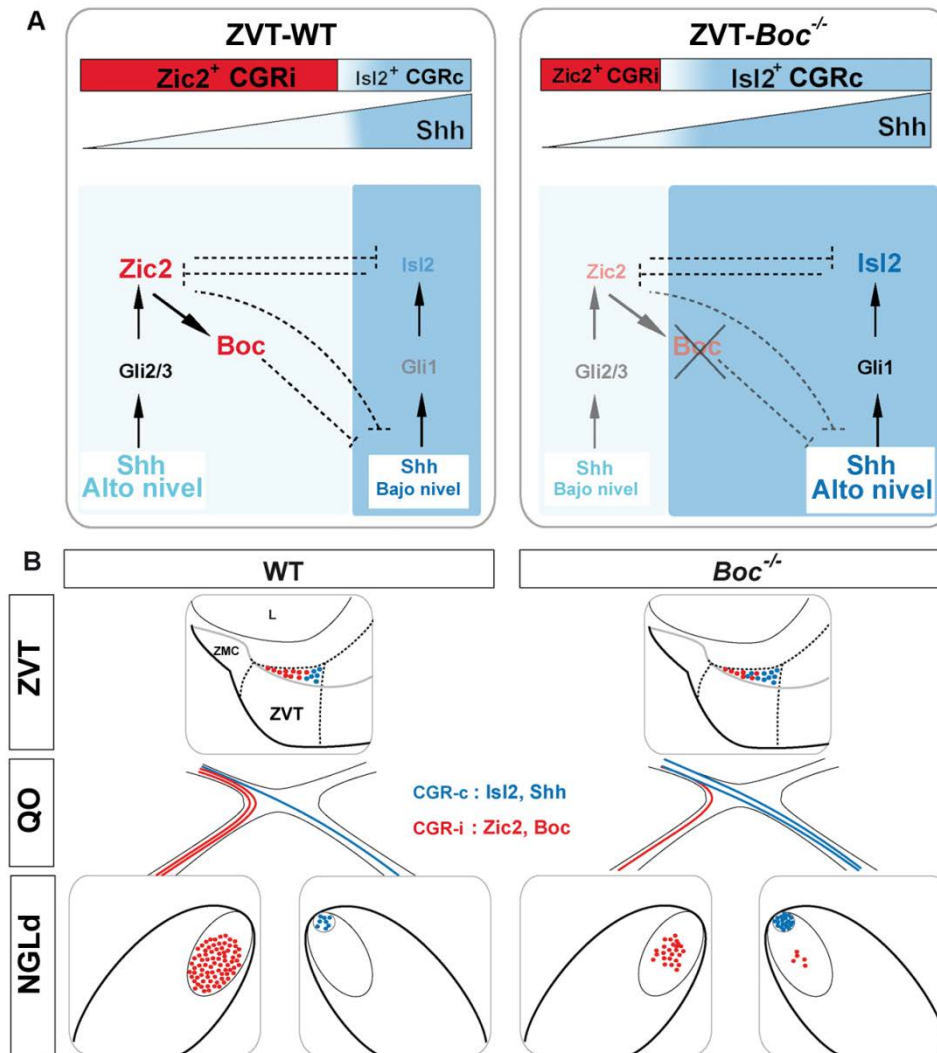


Figura 24. Esquema resumen del mecanismo propuesto para la especificación de las CGR ipsilaterales y contralaterales en la región VT de la retina y sus consecuencias en las proyecciones basado en el análisis del ratón *Boc*^{-/-}.

A, Bucle regulatorio entre la señalización de Shh y Zic2 mediado por Boc, bajas concentraciones de Shh activan a Zic2 conduciendo la generación de CGRi en animales wt. En ausencia de Boc, la región VT recibe altos niveles de Shh procedentes de las CGRc adyacentes, lo que provoca una reducción de la expresión de Zic2 junto con un cambio de identidad a CGRc. B, el cambio de identidad de las CGR va acoplado a cambios en la organización de las proyecciones a nivel del NGLd.

Como hemos visto, el crecimiento de los axones de las CGRi se comportan de una manera distinta a los axones de las CGRc, esto es debido a la presencia de receptores, como EphB1 en los conos de crecimiento de las CGRi, que provocan una recepción de las moléculas de guía axonal diferente a la que tienen los conos de crecimiento de las CGRc. El crecimiento de los axones de las CGR o de otras neuronas dependen de la información de guía axonal y de como los conos de crecimiento sean capaces de interpretar dicha información.

La señalización de Shh como hemos visto anteriormente es un ejemplo de ello. En la medula espinal, Shh secretado por la línea media atrae a los axones de las

Discusión

neuronas comisurales que se encuentran en la región dorsal hacia la línea media ventral, además este morfógeno genera un gradiente antero-posterior, el cual repele a los axones que han cruzado la línea media guándolos hacia la región anterior (Bovolenta, 2005). En la médula espinal de pollo, Shh activa también la expresión de *Sfrp1*, el cual ha sido implicado en el control del gradiente de Wnt que permite el correcto crecimiento longitudinal de los axones de las neuronas comisurales (Domanitskaya et al., 2010; Sanchez-Camacho et al., 2005). En esta tesis hemos mostrado que Sfrps son necesarios para el correcto crecimiento de los axones en la capa de las fibras de la retina, evitando una invasión de las capas profundas de la retina y favoreciendo su entrada en el DO mediante un posible mecanismo directo. Al mismo tiempo, hemos mostrado como Sfrps promueven la cohesión de los axones mediante la inhibición de la actividad de la metaloproteasa ADAM10, la cual posee como sustratos moléculas de adhesión como N-caderina o L1. Además, hemos demostrado que la regulación de las metaloproteasas es crítica para la correcta proyección de las neuronas (Bai and Pfaff, 2011; McFarlane, 2003).

Las anteriores conclusiones se basan en el análisis de los mutantes simples de *Sfrp1* y *Sfrp2*, junto con el análisis del doble mutante. Dichos mutantes muestran defectos en la guía de los axones dentro de la retina, y defectos en la fasciculación de las fibras de las CGR. *Sfrp1* y *Sfrp2* presentan una expresión restringida y solapante en la retina, pero debido a sus propiedades difusibles permiten observar una distribución de la proteína más amplia que la de su ARNm, como hemos podido comprobar mediante técnicas de inmunotinción. Esta distribución fue descrita anteriormente por Mii y Taira (2009) y explicaría la redundancia de función observada (Esteve et al., 2011a; Mii and Taira, 2009; Satoh et al., 2006). Debido a esta redundancia los animales *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} presentaron mayor fenotipo que el resto, seguidos de los animales *Sfrp2*^{-/-}, y por último los animales *Sfrp1*^{-/-}, los cuales solo presentaron pequeños defectos. El acortamiento del eje antero-posterior, la falta de retina periférica, y el incremento en el número de CGR descrito para el mutante *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (Esteve et al., 2011a; Esteve et al., 2011b; Satoh et al., 2006) podría estar influyendo en el fenotipo axonal observado. Sin embargo, el mutante simple *Sfrp2*^{-/-} no presenta estos fenotipos, pero si presenta el fenotipo axonal observado en el doble mutante, lo que parece indicar que los defectos axonales observados en el doble mutante no se deben a los otros defectos descritos.

La distribución de la proteína Sfrp2 en la retina, y en menor medida la de Sfrp1, permite que los axones de las CGR crezcan correctamente en la capa de las fibras sin invadir las capas profundas de la retina. La falta de Sfrp2, en el mutante

simple *Sfrp2*^{-/-} y en el doble mutante *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-}, muestran defectos en el crecimiento de los axones dentro de la retina, siendo estos defectos más comunes en la región periférica de la retina ventral, fenotipo similar al descrito para los mutantes *Robo*^{-/-} y el doble mutante *Slit1*^{-/-};*Slit2*^{-/-} (Plachez et al., 2008; Plump et al., 2002). Igualmente, la abundancia de la proteína Sfrp2 a nivel de DO es fundamental para la correcta salida de los axones de las CGR de la retina, ya que, la ausencia de Sfrp2 en el simple y doble mutante genera fallos en la entrada al DO. Los Sfrps derivados del DO y la laminina localizada a nivel del inicio del NO (Hopker et al., 1999) podrían forzar a los axones de las CGR a entrar al DO, pudiendo ser este mecanismo similar al descrito para la combinación de Netrin1 y laminina (Hopker et al., 1999) o el propuesto para la laminina y EphB1 (Birgbauer et al., 2000; Suh et al., 2004). Estos hechos son concordantes con lo observado en el crecimiento de los axones de las CGR de pollo y *Xenopus*, los cuales son fuertemente repelidos por la combinación de Sfrp1 y laminina. Además, experimentos en *Xenopus* muestran que la adición de Sfrp1 provoca desvíos en el crecimiento de los axones de las CGR a nivel de TO, en el cual la laminina es abundante (Rodriguez et al., 2005).

En ratón, Sfrps no se expresan en las regiones adyacentes a la vía visual, sugiriendo que la proteína de Sfrp localizada en los axones actúa de manera autónoma guiando correctamente a los axones de las CGR. Nuestros datos sugieren que el incorrecto crecimiento de los axones, en los mutantes simples y dobles, podrían deberse a un incremento en la actividad de ADAM10, el cual se expresa abundantemente en las CGR, y cuya actividad se ve incrementada debido a la inactivación génica de *Sfrp1* y *Sfrp2*. En los cultivos de explantes de retina provenientes de embriones nulos para *Sfrp* observamos un crecimiento de las neuritas en forma de “melena”, fenotipo que es atenuado mediante la adición al medio de cultivo de la proteína Sfrp1 o de un inhibidor específico de la actividad de ADAM10. Además, la electroporación de un plásmido de *ADAM10* en explantes de retina provoca un crecimiento de las neuritas pobremente cohesionado, observándose un comportamiento similar al visto en los explantes provenientes de embriones nulos para *Sfrp*. El fragmento proteolizado de N-caderina y L1, dos de los múltiples substratos de ADAM10, se hallan incrementados en la vía visual de los ratones nulos de *Sfrp*, y en los explantes wt que sobreexpresan *ADAM10*, aunque en el caso de los explantes electroporados este aumento no fue tan elevado debido a que solo una porción de las CGR fueron electroporadas. El incremento en el procesamiento de estas moléculas de adhesión podría explicar el crecimiento desfasciculado en los experimentos. Apoyando esta posibilidad, alteraciones en la expresión de L1 y N-caderina, las cuales presentan

Discusión

interacciones homofílicas y heterofílicas, causan defectos similares a los observados en los mutantes de *Sfrp* (Bao, 2008; Bastmeyer et al., 1995; Lemmon et al., 1989; Lyckman et al., 2000; Riehl et al., 1996).

Sin embargo, no podemos excluir que el procesamiento anormal de otras moléculas de guía por medio de ADAM10 no contribuyan también al fenotipo observado en los embriones nulos de *Sfrp*. Aunque, no demostramos un papel de ADAM10 en el procesamiento de Robo2, el sistema de señalización Robo/Slit es todavía un buen candidato, implicando quizá el procesamiento de Slit o a otra metaloproteasa modulada por *Sfrp* diferente de ADAM10. Este hecho explicaría las similitudes en los fenotipos de los animales *Sfrp2^{-/-}* y *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}* con los mutantes de *Robo2* y *Slit* (Plump et al., 2002; Thompson et al., 2009; Thompson et al., 2006a; Thompson et al., 2006b), habiéndose implicado a la activación de Robo2 mediada por Slit en la fasciculación de los axones (Jaworski and Tessier-Lavigne, 2012). Además, los receptores Robo presentan interacciones homofílicas (Hivert et al., 2002) y han sido implicados en la fasciculación de los axones en la vía visual del pez cebra (Devine and Key, 2008). Otras moléculas que no hemos testado son posibles candidatos adicionales, un ejemplo son la señalización que implica a la pareja receptor/ligando Eph/efrina, ya que estas moléculas han sido descritas como substratos de ADAM10 (Weber and Saftig, 2012) y contribuyen a la fasciculación de los axones de las CGR dentro de la retina (Muhleisen et al., 2006). Una posibilidad distinta es que la secreción de Shh esté alterada en los mutantes *Sfrp2^{-/-}* y *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}*, ya que recientes estudios muestran un posible papel de ADAM10 en la liberación de Shh desde las células productoras (Dierker et al., 2009; Ohlig et al., 2011). Remarcar que la interferencia con Shh secretado por las CGR genera defectos en la guía de los axones dentro de la retina, similares a los observados en los mutantes *Sfrp1^{-/-};Sfrp2^{-/-}* (Kolpak et al., 2005; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Además, el bloqueo de la señalización de Shh en *Xenopus* provoca desfasciculación a nivel de TO (Gordon et al., 2010). Al igual que todo lo descrito anteriormente, el receptor de la Netrina1, DCC, es crucial para el crecimiento de los axones de las CGR al principio del NO (Deiner et al., 1997), siendo este receptor procesado también por metaloproteasas, las cuales modulan la señalización del receptor DCC (Galko and Tessier-Lavigne, 2000).

Nuestros estudios no establecen si ADAM10 es el unico mecanismo implicado en el crecimiento desfasciculado de los axones de las CGR que se observa en los mutantes de *Sfrp*. No conocemos si *Sfrp* solo está modulando la actividad de ADAM10 (Esteve et al., 2011a), ya que las proteínas *Sfrps* podrían también modular la actividad de otras metaloproteasas. Aunque, *Adam10* es el único miembro de la familia de las

ADAMs que se expresa mayoritariamente en las CGR, existen otros miembros de la familia que también están presentes en la retina, como son ADAM11, ADAM17 o ADAM28.

Proponemos un papel para *Sfrp1/2* en la guía de los axones de las CGR, pero el fenotipo resultante de la inactivación de una o de ambas moléculas es en ocasiones de una penetrancia leve o incompleta. Existen diversas razones que podrían explicar esta pobre penetrancia. Por ejemplo, la ausencia de *Sfrp1/2* a nivel de DO podría estar siendo compensada por la presencia de *Netrina1* o de *EphB* (Birgbauer et al., 2000; Deiner et al., 1997). Otra posibilidad es que *Sfrp5*, un miembro de la familia de *Sfrp* que se expresa durante el desarrollo del ojo con gran homología con *Sfrp1/2* (Bovolenta et al., 2008; Chang et al., 1999; Ruiz et al., 2009), estuviese compensando los defectos de la deficiencia de *Sfrp1/2*. Por último, la modulación de señales de guía axonal debería ser considerada como el último punto de regulación que organiza el crecimiento de los axones e incrementa su exactitud (Bai and Pfaff, 2011).

La formación de la circuitería de las CGR con el cerebro es un proceso complejo en el cual se ven involucrados diversos procesos. Como hemos visto, la adquisición de una identidad neuronal concreta por parte de una CGR presenta consecuencias en la guía de sus axones a través de la vía visual, lo cual repercute en la proyección de las CGR al cerebro. Nuestros datos demuestran que la modulación de la señalización de Shh por Boc permite la correcta expresión de *Zic2* en la retina de ratón, el cual activa la expresión de *EphB1* que interpreta la información del QO guiando a los axones al TOi. Pero la guía axonal no implica solo la identidad que adquiera la neurona, sino que existen mecanismos que favorecen la correcta guía de los axones de diversos tipos de CGR. Hemos visto como los SFRPs pueden controlar la correcta guía de los axones de las CGR a través de la capa de las fibras, evitando que invadan las capas profundas de la retina. Además, los SFRPs, en ratón, se transportan a través de los axones de las CGR modulando la actividad de la metaloproteasa ADAM10. Hemos observado que ADAM10 en la retina se expresa principalmente en las CGR, y aunque nuestro laboratorio ha descrito un papel en la neurogenesis de la retina mediante la modulación de ADAM10 por los SFRPs, quisimos ver si ese papel ocurría también durante la guía de los axones. ADAM10 presenta una gran cantidad de substratos, nosotros demostramos que la inhibición de la actividad de ADAM10 en los axones de las CGR afectaba a la proteólisis de moléculas de adhesión como son L1 y N-caderina. El procesamiento de estas moléculas tiene repercusiones en los procesos de fasciculación/desfasciculación, los

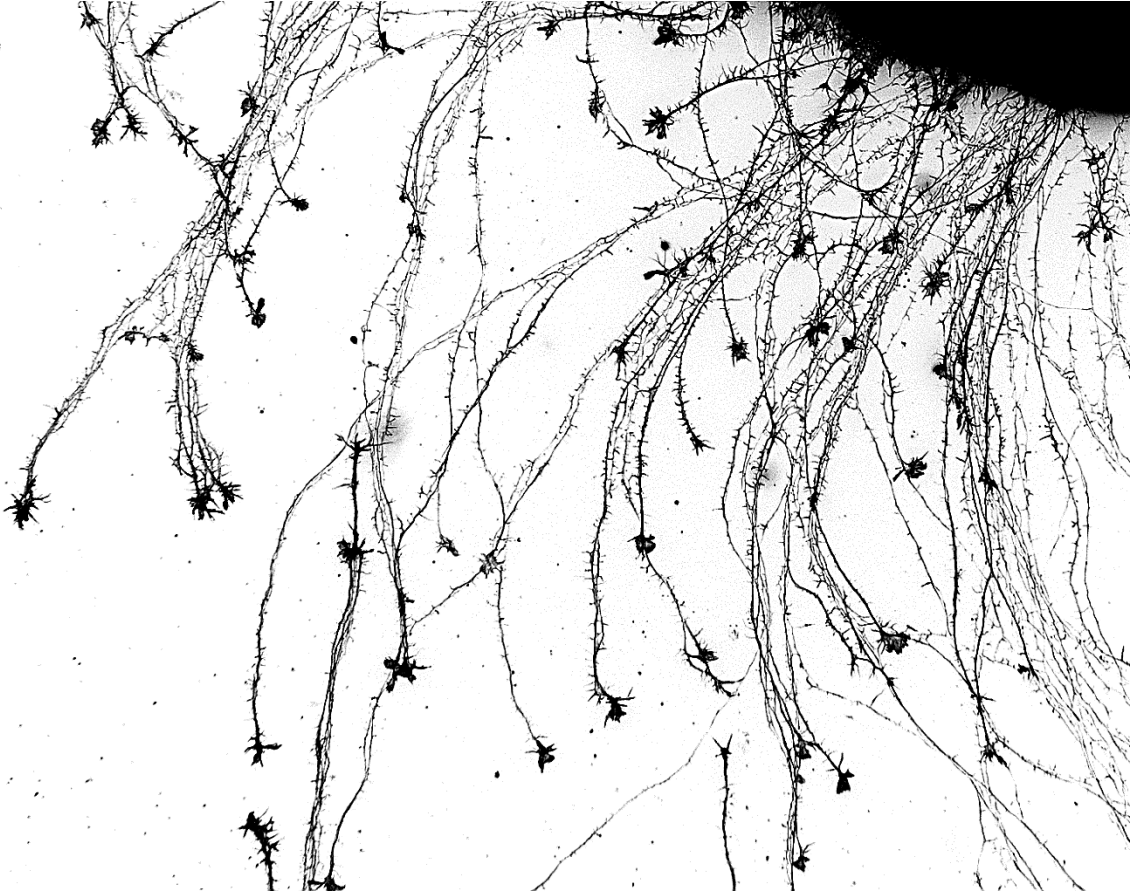
Discusión

cuales son necesarios para un correcto crecimiento de los axones a través de la vía visual.

Estos datos añaden nuevas evidencias de los múltiples papeles que la señalización de Shh y Sfrps juegan en el desarrollo de la retina y la formación de la circuitería de las CGR con el cerebro. Estas funciones se deben a la localización de la proteína, los niveles de expresión y la interacción con otras moléculas. El papel de Boc en la modulación de la señalización Shh, actuando como regulador positivo o negativo de la vía tiene gran repercusión, ya que, no solo actúa en procesos de diferenciación/proliferación en la retina, sino que está implicado en procesos de proliferación/diferenciación en diversas partes del organismo, siendo incluso implicado en procesos de cáncer, en los cuales Zic2 y la señalización de Shh están muy relacionados (Chan et al., 2011). Además la señalización de Shh y Zic2 están implicados en procesos de HPE (Dubourg et al., 2004), en los cuales Boc, Cdon y Gas1 también están involucrados mediante la modulación de la señalización de shh (Bae et al., 2011; Seppala et al., 2014). Por lo que nuestros datos aportan un conocimiento más profundo de como estas moléculas pueden interaccionar.

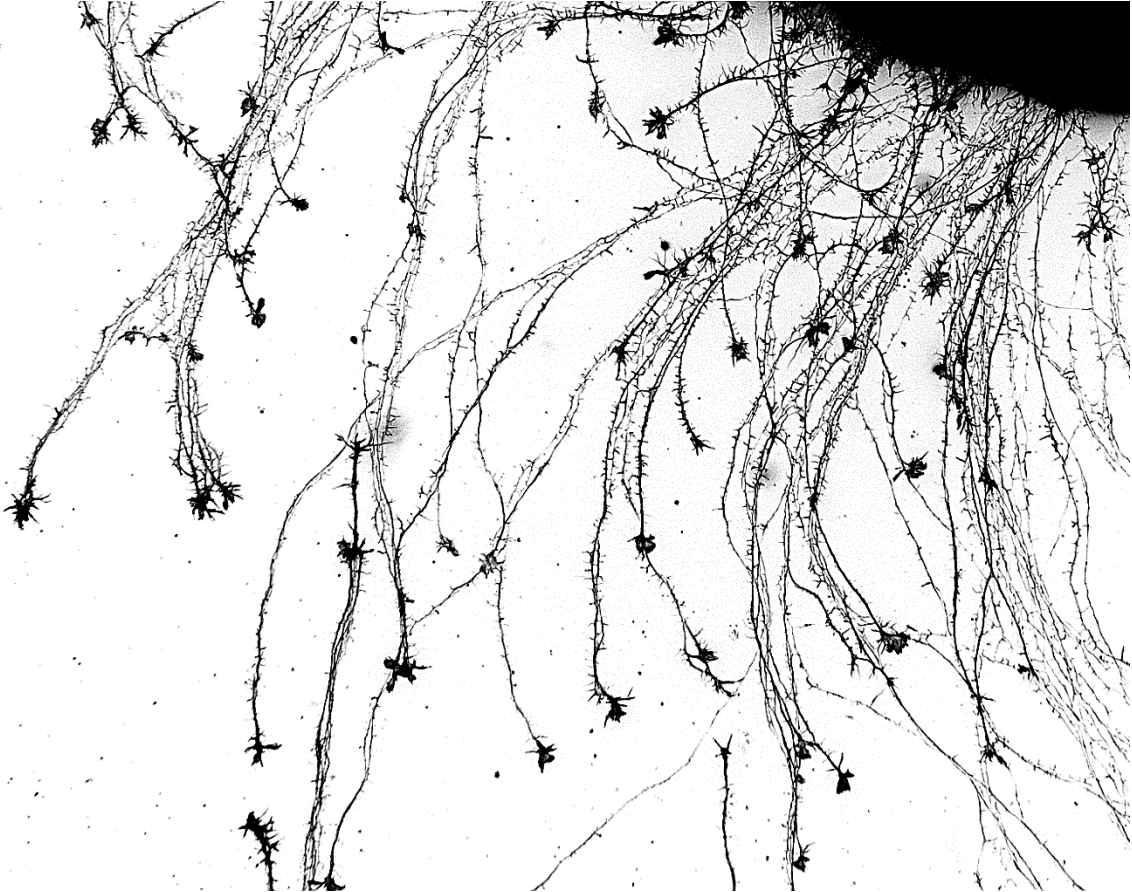
Además el papel de Sfrp como modulador de eventos de difusión o procesamiento es especialmente interesante, ya que estos procesamientos no solo funcionan en la guía de los axones, sino que estos procesos ocurren durante la adhesión celular, la migración celular, procesos inflamatorios o durante la activación de la señalización e incluso durante la finalización de esta. Además, las proteínas que regulan los procesos de difusión o procesamiento no solo se expresan durante la formación de la circuitería del cerebro, sino que se expresan en el SNC adulto participando en procesos de mantenimiento, reparación y plasticidad neuronal (Saxena and Caroni, 2007). Nuestros descubrimientos podrían ser relevantes en procesos de neurodegeneración y de enfermedades vasculares, ya que en estos procesos se encuentran implicadas este grupo de moléculas (Jones and Li, 2007).

Conclusiones



- Boc es necesario pero no suficiente para la formación de la proyección ipsilateral de la retina de ratón.
- Zic2 controla directa o indirectamente la expresión de Boc en la región Ventro-Temporal de la retina de ratón.
- Boc es necesario para mantener la correcta proporción de CGRi/CGRc en la región Ventro-Temporal de la retina de ratón.
- La ausencia de Boc aumenta el número de fibras que proyectan en la región más dorsal del NGLd, región diana de las CGRc situadas en la región Ventro-Temporal de la retina. Por el contrario se observa una disminución en el número de fibras en la región de proyección de las CGRi.
- El aumento de los niveles de Shh en la región Ventro-Temporal de la retina disminuyen la expresión de Zic2.
- Sfrp1/2 se expresa durante el desarrollo en la retina de ratón.
- Las proteínas Sfrp1/2 se localizan en el axón de las CGR de ratón.
- La ausencia de Sfrp1/2 genera defectos en la guía de los axones a nivel de retina, QO y TO.
- SFRPs controlan la fasciculación de las neuritas en explantes de retina mediante la modulación de la actividad de ADAM10.
- ADAM10 promueve la desfasciculación de los axones mediante el procesamiento de las moléculas de adhesión N-caderina y L1.

Bibliografía



Aglyamova, G.V., Agarwala, S., 2007. Gene expression analysis of the hedgehog signaling cascade in the chick midbrain and spinal cord. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 236, 1363-1373.

Alcedo, J., Ayzenzon, M., Von Ohlen, T., Noll, M., Hooper, J.E., 1996. The *Drosophila* smoothened gene encodes a seven-pass membrane protein, a putative receptor for the hedgehog signal. *Cell* 86, 221-232.

Allen, B.L., Song, J.Y., Izzi, L., Althaus, I.W., Kang, J.S., Charron, F., Krauss, R.S., McMahon, A.P., 2011. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Developmental cell* 20, 775-787.

Allen, B.L., Tenzen, T., McMahon, A.P., 2007. The Hedgehog-binding proteins Gas1 and Cdo cooperate to positively regulate Shh signaling during mouse development. *Genes & development* 21, 1244-1257.

Aruga, J., 2004. The role of Zic genes in neural development. *Molecular and cellular neurosciences* 26, 205-221.

Aruga, J., Tohmonda, T., Homma, S., Mikoshiba, K., 2002. Zic1 promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Developmental biology* 244, 329-341.

Austin, C.P., Feldman, D.E., Ida, J.A., Jr., Cepko, C.L., 1995. Vertebrate retinal ganglion cells are selected from competent progenitors by the action of Notch. *Development* 121, 3637-3650.

Bae, G.U., Domene, S., Roessler, E., Schachter, K., Kang, J.S., Muenke, M., Krauss, R.S., 2011. Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *American journal of human genetics* 89, 231-240.

Bai, G., Pfaff, S.L., 2011. Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron* 72, 9-21.

Banziger, C., Soldini, D., Schutt, C., Zipperlen, P., Hausmann, G., Basler, K., 2006. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell* 125, 509-522.

Bao, Z.Z., 2008. Intraretinal projection of retinal ganglion cell axons as a model system for studying axon navigation. *Brain research* 1192, 165-177.

Bartscherer, K., Pelte, N., Ingelfinger, D., Boutros, M., 2006. Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125, 523-533.

Bastmeyer, M., Ott, H., Leppert, C.A., Stuermer, C.A., 1995. Fish E587 glycoprotein, a member of the L1 family of cell adhesion molecules, participates in axonal fasciculation and the age-related order of ganglion cell axons in the goldfish retina. *The Journal of cell biology* 130, 969-976.

Beachy, P.A., Cooper, M.K., Young, K.E., von Kessler, D.P., Park, W.J., Hall, T.M., Leahy, D.J., Porter, J.A., 1997. Multiple roles of cholesterol in hedgehog protein biogenesis and signaling. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* 62, 191-204.

Bibliografía

Beachy, P.A., Hymowitz, S.G., Lazarus, R.A., Leahy, D.J., Siebold, C., 2010. Interactions between Hedgehog proteins and their binding partners come into view. *Genes & development* 24, 2001-2012.

Becker, C.G., Schweitzer, J., Feldner, J., Becker, T., Schachner, M., 2003. Tenascin-R as a repellent guidance molecule for developing optic axons in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 23, 6232-6237.

Bergeron, S.A., Tyurina, O.V., Miller, E., Bagas, A., Karlstrom, R.O., 2011. Brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish. *Development* 138, 75-85.

Bilioni, A., Sanchez-Hernandez, D., Callejo, A., Gradilla, A.C., Ibanez, C., Mollica, E., Carmen Rodriguez-Navas, M., Simon, E., Guerrero, I., 2013. Balancing Hedgehog, a retention and release equilibrium given by Dally, Ihog, Boi and shifted/DmWif. *Developmental biology* 376, 198-212.

Birgbauer, E., Cowan, C.A., Sretavan, D.W., Henkemeyer, M., 2000. Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127, 1231-1241.

Bovolenta, P., 2005. Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *Journal of neurobiology* 64, 405-416.

Bovolenta, P., Esteve, P., Ruiz, J.M., Cisneros, E., Lopez-Rios, J., 2008. Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *Journal of cell science* 121, 737-746.

Bovolenta, P., Rodriguez, J., Esteve, P., 2006. Frizzled/RYK mediated signalling in axon guidance. *Development* 133, 4399-4408.

Briscoe, J., Therond, P.P., 2013. The mechanisms of Hedgehog signalling and its roles in development and disease. *Nature reviews. Molecular cell biology* 14, 416-429.

Brown, L.Y., Kottmann, A.H., Brown, S., 2003. Immunolocalization of Zic2 expression in the developing mouse forebrain. *Gene Expression Patterns* 3, 361-367.

Burke, R., Nellen, D., Bellotto, M., Hafen, E., Senti, K.A., Dickson, B.J., Basler, K., 1999. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell* 99, 803-815.

Callejo, A., Bilioni, A., Mollica, E., Gorfinkel, N., Andres, G., Ibanez, C., Torroja, C., Doglio, L., Sierra, J., Guerrero, I., 2011. Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the Drosophila wing disk epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12591-12598.

Camp, D., Currie, K., Labbe, A., van Meyel, D.J., Charron, F., 2010. Ihog and Boi are essential for Hedgehog signaling in Drosophila. *Neural development* 5, 28.

Cardozo, M.J., Sanchez-Arrones, L., Sandonis, A., Sanchez-Camacho, C., Gestri, G., Wilson, S.W., Guerrero, I., Bovolenta, P., 2014. Cdon acts as a Hedgehog decoy receptor during proximal-distal patterning of the optic vesicle. *Nat Commun* 5, 4272.

- Carreres, M.I., Escalante, A., Murillo, B., Chauvin, G., Gaspar, P., Vegar, C., Herrera, E., 2011. Transcription factor Foxd1 is required for the specification of the temporal retina in mammals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 31, 5673-5681.
- Casparly, T., Garcia-Garcia, M.J., Huangfu, D., Eggenschwiler, J.T., Wyler, M.R., Rakeman, A.S., Alcorn, H.L., Anderson, K.V., 2002. Mouse Dispatched homolog1 is required for long-range, but not juxtacrine, Hh signaling. *Current biology : CB* 12, 1628-1632.
- Cepko, C., 2014. Intrinsically different retinal progenitor cells produce specific types of progeny. *Nature reviews. Neuroscience* 15, 615-627.
- Cepko, C.L., Austin, C.P., Yang, X., Alexiades, M., Ezzeddine, D., 1996. Cell fate determination in the vertebrate retina. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 589-595.
- Cohen, J., Burne, J.F., McKinlay, C., Winter, J., 1987. The role of laminin and the laminin/fibronectin receptor complex in the outgrowth of retinal ganglion cell axons. *Developmental biology* 122, 407-418.
- Coleman, H.A., Labrador, J.P., Chance, R.K., Bashaw, G.J., 2010. The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development* 137, 2417-2426.
- Connor, R.M., Allen, C.L., Devine, C.A., Claxton, C., Key, B., 2005. BOC, brother of CDO, is a dorsoventral axon-guidance molecule in the embryonic vertebrate brain. *The Journal of comparative neurology* 485, 32-42.
- Couso, J.P., 2011. Hedgehog, Patched and Dispatched near the basement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108, 12565-12566.
- Chamberlain, C.E., Jeong, J., Guo, C., Allen, B.L., McMahon, A.P., 2008. Notochord-derived Shh concentrates in close association with the apically positioned basal body in neural target cells and forms a dynamic gradient during neural patterning. *Development* 135, 1097-1106.
- Chan, D.W., Liu, V.W., Leung, L.Y., Yao, K.M., Chan, K.K., Cheung, A.N., Ngan, H.Y., 2011. Zic2 synergistically enhances Hedgehog signalling through nuclear retention of Gli1 in cervical cancer cells. *The Journal of pathology* 225, 525-534.
- Chang, D.T., Lopez, A., von Kessler, D.P., Chiang, C., Simandl, B.K., Zhao, R., Seldin, M.F., Fallon, J.F., Beachy, P.A., 1994. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development* 120, 3339-3353.
- Chang, J.T., Esumi, N., Moore, K., Li, Y., Zhang, S., Chew, C., Goodman, B., Rattner, A., Moody, S., Stetten, G., Campochiaro, P.A., Zack, D.J., 1999. Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Human molecular genetics* 8, 575-583.
- Chen, S., Li, H., Gaudenz, K., Paulson, A., Guo, F., Trimble, R., Peak, A., Seidel, C., Deng, C., Furuta, Y., Xie, T., 2013. Defective FGF signaling causes coloboma formation and disrupts retinal neurogenesis. *Cell research* 23, 254-273.

Bibliografía

Chow, R.L., Lang, R.A., 2001. Early eye development in vertebrates. *Annual review of cell and developmental biology* 17, 255-296.

Christ, A., Christa, A., Kur, E., Lioubinski, O., Bachmann, S., Willnow, T.E., Hammes, A., 2012. LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Developmental cell* 22, 268-278.

Dakubo, G.D., 2003. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog signaling is required for optic disc and stalk neuroepithelial cell development. *Development* 130, 2967-2980.

Deiner, M.S., Kennedy, T.E., Fazeli, A., Serafini, T., Tessier-Lavigne, M., Sretavan, D.W., 1997. Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19, 575-589.

Dessaud, E., Yang, L.L., Hill, K., Cox, B., Ulloa, F., Ribeiro, A., Mynett, A., Novitsch, B.G., Briscoe, J., 2007. Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450, 717-720.

Devine, C.A., Key, B., 2008. Robo-Slit interactions regulate longitudinal axon pathfinding in the embryonic vertebrate brain. *Developmental biology* 313, 371-383.

Dickson, B.J., 2002. Molecular mechanisms of axon guidance. *Science* 298, 1959-1964.

Dierker, T., Dreier, R., Petersen, A., Bordych, C., Grobe, K., 2009. Heparan sulfate-modulated, metalloprotease-mediated sonic hedgehog release from producing cells. *The Journal of biological chemistry* 284, 8013-8022.

Domanitskaya, E., Wacker, A., Mauti, O., Baeriswyl, T., Esteve, P., Bovolenta, P., Stoeckli, E.T., 2010. Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 11167-11176.

Drager, U.C., 1985. Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character*. Royal Society 224, 57-77.

Drager, U.C., Olsen, J.F., 1980. Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *The Journal of comparative neurology* 191, 383-412.

Dubourg, C., Lazaro, L., Pasquier, L., Bendavid, C., Blayau, M., Le Duff, F., Durou, M.R., Odent, S., David, V., 2004. Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGIF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Human mutation* 24, 43-51.

Echelard, Y., Epstein, D.J., St-Jacques, B., Shen, L., Mohler, J., McMahon, J.A., McMahon, A.P., 1993. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell* 75, 1417-1430.

Erkman, L., McEvilly, R.J., Luo, L., Ryan, A.K., Hooshmand, F., O'Connell, S.M., Keithley, E.M., Rapaport, D.H., Ryan, A.F., Rosenfeld, M.G., 1996. Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* 381, 603-606.

Erskine, L., Herrera, E., 2007. The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Developmental biology* 308, 1-14.

Erskine, L., Herrera, E., 2014. Connecting the retina to the brain. *ASN neuro* 6.

Erskine, L., Reijntjes, S., Pratt, T., Denti, L., Schwarz, Q., Vieira, J.M., Alakakone, B., Shewan, D., Ruhrberg, C., 2011. VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron* 70, 951-965.

Esteve, P., Bovolenta, P., 2006. Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Current opinion in neurobiology* 16, 13-19.

Esteve, P., Lopez-Rios, J., Bovolenta, P., 2004. SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish. *Mechanisms of development* 121, 687-701.

Esteve, P., Sandonis, A., Cardozo, M., Malapeira, J., Ibanez, C., Crespo, I., Marcos, S., Gonzalez-Garcia, S., Toribio, M.L., Arribas, J., Shimono, A., Guerrero, I., Bovolenta, P., 2011a. SFRPs act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nature neuroscience* 14, 562-569.

Esteve, P., Sandonis, A., Ibanez, C., Shimono, A., Guerrero, I., Bovolenta, P., 2011b. Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/beta-catenin signalling activation in the vertebrate optic cup. *Development* 138, 4179-4184.

Esteve, P., Trousse, F., Rodriguez, J., Bovolenta, P., 2003. SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *Journal of cell science* 116, 2471-2481.

Fabre, P.J., Shimogori, T., Charron, F., 2010. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 266-275.

Galko, M.J., Tessier-Lavigne, M., 2000. Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* 289, 1365-1367.

Garcia-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., Herrera, E., 2007. Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC developmental biology* 7, 103.

Garcia-Frigola, C., Carreres, M.I., Vegar, C., Mason, C., Herrera, E., 2008. Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development* 135, 1833-1841.

Garcia-Frigola, C., Herrera, E., 2010. Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. *The EMBO journal* 29, 3170-3183.

Goodrich, L.V., Johnson, R.L., Milenkovic, L., McMahon, J.A., Scott, M.P., 1996. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes & development* 10, 301-312.

Gordon, L., Mansh, M., Kinsman, H., Morris, A.R., 2010. *Xenopus sonic hedgehog guides retinal axons along the optic tract. Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 239, 2921-2932.

Bibliografía

Gradilla, A.C., Gonzalez, E., Seijo, I., Andres, G., Bischoff, M., Gonzalez-Mendez, L., Sanchez, V., Callejo, A., Ibanez, C., Guerra, M., Ortigao-Farias, J.R., Sutherland, J.D., Gonzalez, M., Barrio, R., Falcon-Perez, J.M., Guerrero, I., 2014. Exosomes as Hedgehog carriers in cytoneme-mediated transport and secretion. *Nat Commun* 5, 5649.

Hartman, T.R., Zinshteyn, D., Schofield, H.K., Nicolas, E., Okada, A., O'Reilly, A.M., 2010. *Drosophila* Boi limits Hedgehog levels to suppress follicle stem cell proliferation. *The Journal of cell biology* 191, 943-952.

Harwell, C.C., Parker, P.R., Gee, S.M., Okada, A., McConnell, S.K., Kreitzer, A.C., Kriegstein, A.R., 2012. Sonic hedgehog expression in corticofugal projection neurons directs cortical microcircuit formation. *Neuron* 73, 1116-1126.

Hauck, S.M., Hofmaier, F., Dietter, J., Swadzba, M.E., Blindert, M., Amann, B., Behler, J., Kremmer, E., Ueffing, M., Deeg, C.A., 2012. Label-free LC-MSMS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *Journal of proteomics* 75, 4545-4554.

Hayhurst, M., Gore, B.B., Tessier-Lavigne, M., McConnell, S.K., 2008. Ongoing sonic hedgehog signaling is required for dorsal midline formation in the developing forebrain. *Developmental neurobiology* 68, 83-100.

Herrera, E., Brown, L., Aruga, J., Rachel, R.A., Dolen, G., Mikoshiba, K., Brown, S., Mason, C.A., 2003. Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114, 545-557.

Hivert, B., Liu, Z., Chuang, C.Y., Doherty, P., Sundaresan, V., 2002. Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Molecular and cellular neurosciences* 21, 534-545.

Hoang, B., Moos, M., Jr., Vukicevic, S., Luyten, F.P., 1996. Primary structure and tissue distribution of FRZB, a novel protein related to *Drosophila* frizzled, suggest a role in skeletal morphogenesis. *The Journal of biological chemistry* 271, 26131-26137.

Hooper, J.E., Scott, M.P., 1989. The *Drosophila* patched gene encodes a putative membrane protein required for segmental patterning. *Cell* 59, 751-765.

Hopker, V.H., Shewan, D., Tessier-Lavigne, M., Poo, M., Holt, C., 1999. Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401, 69-73.

Hui, C.C., Angers, S., 2011. Gli proteins in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 27, 513-537.

Ingham, P.W., McMahon, A.P., 2001. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes & development* 15, 3059-3087.

Izzi, L., Levesque, M., Morin, S., Laniel, D., Wilkes, B.C., Mille, F., Krauss, R.S., McMahon, A.P., Allen, B.L., Charron, F., 2011. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Developmental cell* 20, 788-801.

Jakobs, P., Exner, S., Schurmann, S., Pickhinke, U., Bandari, S., Ortmann, C., Kupich, S., Schulz, P., Hansen, U., Seidler, D.G., Grobe, K., 2014. Scube2 enhances proteolytic Shh processing from the surface of Shh-producing cells. *Journal of cell science* 127, 1726-1737.

- Jaubert-Miazza, L., Green, E., Lo, F.S., Bui, K., Mills, J., Guido, W., 2005. Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Visual neuroscience* 22, 661-676.
- Jaworski, A., Tessier-Lavigne, M., 2012. Autocrine/juxtacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. *Nature neuroscience* 15, 367-369.
- Jeffery, G., Erskine, L., 2005. Variations in the architecture and development of the vertebrate optic chiasm. *Progress in Retinal and Eye Research* 24, 721-753.
- Jensen, A.M., Wallace, V.A., 1997. Expression of Sonic hedgehog and its putative role as a precursor cell mitogen in the developing mouse retina. *Development* 124, 363-371.
- Jones, C.A., Li, D.Y., 2007. Common cues regulate neural and vascular patterning. *Current opinion in genetics & development* 17, 332-336.
- Kang, J.S., Mulieri, P.J., Hu, Y., Taliana, L., Krauss, R.S., 2002. BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *The EMBO journal* 21, 114-124.
- Kawano, Y., Kypta, R., 2003. Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* 116, 2627-2634.
- Kitambi, S.S., Malicki, J.J., 2008. Spatiotemporal features of neurogenesis in the retina of medaka, *Oryzias latipes*. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 237, 3870-3881.
- Klaus, B., Schulte-Merker, S., Tautz, D., 1999. Zebrafish *zic1* expression in brain and somites is affected by BMP and Hedgehog signalling. *Mechanisms of development* 85, 147-159.
- Kolpak, A., Zhang, J., Bao, Z.Z., 2005. Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 3432-3441.
- Kornberg, T., 1999. Pictures in cell biology. Cytonemes. *Trends in cell biology* 9, 434.
- Krauss, S., Concordet, J.P., Ingham, P.W., 1993. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell* 75, 1431-1444.
- Lee, C.S., May, N.R., Fan, C.M., 2001. Transdifferentiation of the ventral retinal pigmented epithelium to neural retina in the growth arrest specific gene 1 mutant. *Developmental biology* 236, 17-29.
- Lee, R., Petros, T.J., Mason, C.A., 2008. *Zic2* regulates retinal ganglion cell axon avoidance of ephrinB2 through inducing expression of the guidance receptor EphB1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28, 5910-5919.
- Lek, M., Dias, J.M., Marklund, U., Uhde, C.W., Kurdija, S., Lei, Q., Sussel, L., Rubenstein, J.L., Matise, M.P., Arnold, H.H., Jessell, T.M., Ericson, J., 2010. A homeodomain feedback circuit underlies step-function interpretation of a Shh morphogen gradient during ventral neural patterning. *Development* 137, 4051-4060.

Bibliografía

Lemmon, V., Farr, K.L., Lagenaur, C., 1989. L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2, 1597-1603.

Levine, E.M., Roelink, H., Turner, J., Reh, T.A., 1997. Sonic hedgehog promotes rod photoreceptor differentiation in mammalian retinal cells in vitro. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 17, 6277-6288.

Leyns, L., Bouwmeester, T., Kim, S.H., Piccolo, S., De Robertis, E.M., 1997. Frzb-1 is a secreted antagonist of Wnt signaling expressed in the Spemann organizer. *Cell* 88, 747-756.

Li, Q., Shirabe, K., Thisse, C., Thisse, B., Okamoto, H., Masai, I., Kuwada, J.Y., 2005a. Chemokine signaling guides axons within the retina in zebrafish. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 1711-1717.

Li, X., Zhang, Y., Kang, H., Liu, W., Liu, P., Zhang, J., Harris, S.E., Wu, D., 2005b. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* 280, 19883-19887.

Lin, C.T., Lin, Y.T., Kuo, T.F., 2007. Investigation of mRNA expression for secreted frizzled-related protein 2 (sFRP2) in chick embryos. *The Journal of reproduction and development* 53, 801-810.

Lin, K., Wang, S., Julius, M.A., Kitajewski, J., Moos, M., Jr., Luyten, F.P., 1997. The cysteine-rich frizzled domain of Frzb-1 is required and sufficient for modulation of Wnt signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 11196-11200.

Liu, H., Mohamed, O., Dufort, D., Wallace, V.A., 2003a. Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 227, 323-334.

Liu, J., Wilson, S., Reh, T., 2003b. BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. *Developmental biology* 256, 34-48.

Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annual review of cell and developmental biology* 20, 781-810.

Luo, L., 2006. Developmental neuroscience: two gradients are better than one. *Nature* 439, 23-24.

Lyckman, A.W., Moya, K.L., Confaloni, A., Jhaveri, S., 2000. Early postnatal expression of L1 by retinal fibers in the optic tract and synaptic targets of the Syrian hamster. *The Journal of comparative neurology* 423, 40-51.

Marti, E., Bovolenta, P., 2002. Sonic hedgehog in CNS development: one signal, multiple outputs. *Trends in neurosciences* 25, 89-96.

Martinez-Morales, J.R., Del Bene, F., Nica, G., Hammerschmidt, M., Bovolenta, P., Wittbrodt, J., 2005. Differentiation of the vertebrate retina is coordinated by an FGF signaling center. *Developmental cell* 8, 565-574.

Masai, I., Lele, Z., Yamaguchi, M., Komori, A., Nakata, A., Nishiwaki, Y., Wada, H., Tanaka, H., Nojima, Y., Hammerschmidt, M., Wilson, S.W., Okamoto, H., 2003. N-

cadherin mediates retinal lamination, maintenance of forebrain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* 130, 2479-2494.

McCarthy, R.A., Barth, J.L., Chintalapudi, M.R., Knaak, C., Argraves, W.S., 2002. Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *The Journal of biological chemistry* 277, 25660-25667.

McFarlane, S., 2003. Metalloproteases: carving out a role in axon guidance. *Neuron* 37, 559-562.

McLellan, J.S., Zheng, X., Hauk, G., Ghirlando, R., Beachy, P.A., Leahy, D.J., 2008. The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature* 455, 979-983.

McMahon, A.P., Hasso, S.M., 2013. Filopodia: the cellular quills of hedgehog signaling? *Developmental cell* 25, 328-330.

Mi, Z.P., Weng, W., Hankin, M.H., Narayanan, V., Lagenaur, C.F., 1998. Maturation changes in cell surface antigen expression in the mouse retina and optic pathway. *Brain research. Developmental brain research* 106, 145-154.

Mii, Y., Taira, M., 2009. Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136, 4083-4088.

Mille, F., Tamayo-Orrego, L., Levesque, M., Remke, M., Korshunov, A., Cardin, J., Bouchard, N., Izzi, L., Kool, M., Northcott, P.A., Taylor, M.D., Pfister, S.M., Charron, F., 2014. The Shh receptor Boc promotes progression of early medulloblastoma to advanced tumors. *Developmental cell* 31, 34-47.

Morcillo, J., Martinez-Morales, J.R., Trousse, F., Fermin, Y., Sowden, J.C., Bovolenta, P., 2006. Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* 133, 3179-3190.

Mu, X., Fu, X., Sun, H., Liang, S., Maeda, H., Frishman, L.J., Klein, W.H., 2005. Ganglion cells are required for normal progenitor- cell proliferation but not cell-fate determination or patterning in the developing mouse retina. *Current biology : CB* 15, 525-530.

Muhleisen, T.W., Agoston, Z., Schulte, D., 2006. Retroviral misexpression of cVax disturbs retinal ganglion cell axon fasciculation and intraretinal pathfinding in vivo and guidance of nasal ganglion cell axons in vivo. *Developmental biology* 297, 59-73.

Mulieri, P.J., Kang, J.S., Sassoon, D.A., Krauss, R.S., 2002. Expression of the boc gene during murine embryogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 223, 379-388.

Mulieri, P.J., Okada, A., Sassoon, D.A., McConnell, S.K., Krauss, R.S., 2000. Developmental expression pattern of the cdo gene. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 219, 40-49.

Nakano, Y., Guerrero, I., Hidalgo, A., Taylor, A., Whittle, J.R., Ingham, P.W., 1989. A protein with several possible membrane-spanning domains encoded by the *Drosophila* segment polarity gene patched. *Nature* 341, 508-513.

Bibliografía

Nakano, Y., Kim, H.R., Kawakami, A., Roy, S., Schier, A.F., Ingham, P.W., 2004. Inactivation of dispatched 1 by the chameleon mutation disrupts Hedgehog signalling in the zebrafish embryo. *Developmental biology* 269, 381-392.

Neumann, C.J., Nusslein-Volhard, C., 2000. Patterning of the zebrafish retina by a wave of sonic hedgehog activity. *Science* 289, 2137-2139.

Nieto-Lopez, F., Sanchez-Arrones, L., 2014. In utero Electroporation of the Embryonic Mouse Retina, in: 4(19) (Ed.), e1255. Bio-protocol, <http://www.bio-protocol.org/e1255>.

Nusslein-Volhard, C., Wieschaus, E., 1980. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 287, 795-801.

Ohlig, S., Farshi, P., Pickhinke, U., van den Boom, J., Hoing, S., Jakushev, S., Hoffmann, D., Dreier, R., Scholer, H.R., Dierker, T., Bordych, C., Grobe, K., 2011. Sonic hedgehog shedding results in functional activation of the solubilized protein. *Developmental cell* 20, 764-774.

Okada, A., Charron, F., Morin, S., Shin, D.S., Wong, K., Fabre, P.J., Tessier-Lavigne, M., McConnell, S.K., 2006. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444, 369-373.

Pages, F., Kerridge, S., 2000. Morphogen gradients. A question of time or concentration? *Trends in genetics : TIG* 16, 40-44.

Pak, W., Hindges, R., Lim, Y.S., Pfaff, S.L., O'Leary, D.D., 2004. Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell* 119, 567-578.

Pandolfi, S., Stecca, B., 2015. Cooperative integration between HEDGEHOG-GLI signalling and other oncogenic pathways: implications for cancer therapy. *Expert reviews in molecular medicine* 17, e5.

Paridaen, J.T., Danesin, C., Elas, A.T., van de Water, S., Houart, C., Zivkovic, D., 2009. Apc1-mediated antagonism of Wnt/beta-catenin signaling is required for retino-tectal pathfinding in the zebrafish. *Zebrafish* 6, 41-47.

Petros, T.J., Shrestha, B.R., Mason, C., 2009. Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 3463-3474.

Plachez, C., Andrews, W., Liapi, A., Knoell, B., Drescher, U., Mankoo, B., Zhe, L., Mambetisaeva, E., Annan, A., Bannister, L., Parnavelas, J.G., Richards, L.J., Sundaresan, V., 2008. Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Molecular and cellular neurosciences* 37, 719-730.

Plump, A.S., Erskine, L., Sabatier, C., Brose, K., Epstein, C.J., Goodman, C.S., Mason, C.A., Tessier-Lavigne, M., 2002. Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33, 219-232.

Quina, L.A., Pak, W., Lanier, J., Banwait, P., Gratwick, K., Liu, Y., Velasquez, T., O'Leary, D.D., Goulding, M., Turner, E.E., 2005. Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 25, 11595-11604.

Ramirez-Weber, F.A., Kornberg, T.B., 1999. Cytonemes: cellular processes that project to the principal signaling center in *Drosophila* imaginal discs. *Cell* 97, 599-607.

Rattner, A., Hsieh, J.C., Smallwood, P.M., Gilbert, D.J., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Nathans, J., 1997. A family of secreted proteins contains homology to the cysteine-rich ligand-binding domain of frizzled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 2859-2863.

Rebsam, A., Bhansali, P., Mason, C.A., 2012. Eye-specific projections of retinogeniculate axons are altered in albino mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 32, 4821-4826.

Rebsam, A., Petros, T.J., Mason, C.A., 2009. Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 14855-14863.

Reiss, K., Maretzky, T., Ludwig, A., Tousseyn, T., de Strooper, B., Hartmann, D., Saftig, P., 2005. ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *The EMBO journal* 24, 742-752.

Rhee, J., Mahfooz, N.S., Arregui, C., Lilien, J., Balsamo, J., VanBerkum, M.F., 2002. Activation of the repulsive receptor Roundabout inhibits N-cadherin-mediated cell adhesion. *Nature cell biology* 4, 798-805.

Ribes, V., Balaskas, N., Sasai, N., Cruz, C., Dessaud, E., Cayuso, J., Tozer, S., Yang, L.L., Novitch, B., Marti, E., Briscoe, J., 2010. Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes & development* 24, 1186-1200.

Riddle, R.D., Johnson, R.L., Laufer, E., Tabin, C., 1993. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell* 75, 1401-1416.

Riedle, S., Kiefel, H., Gast, D., Bondong, S., Wolterink, S., Gutwein, P., Altevogt, P., 2009. Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *The Biochemical journal* 420, 391-402.

Riehl, R., Johnson, K., Bradley, R., Grunwald, G.B., Cornel, E., Lilienbaum, A., Holt, C.E., 1996. Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 17, 837-848.

Rodriguez, J., Esteve, P., Weinl, C., Ruiz, J.M., Fermin, Y., Trousse, F., Dwivedy, A., Holt, C., Bovolenta, P., 2005. SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nature neuroscience* 8, 1301-1309.

Roelink, H., Augsburger, A., Heemskerk, J., Korzh, V., Norlin, S., Ruiz i Altaba, A., Tanabe, Y., Placzek, M., Edlund, T., Jessell, T.M., et al., 1994. Floor plate and motor neuron induction by vhh-1, a vertebrate homolog of hedgehog expressed by the notochord. *Cell* 76, 761-775.

Ruiz, J.M., Rodriguez, J., Bovolenta, P., 2009. Growth and differentiation of the retina and the optic tectum in the medaka fish requires olSfrp5. *Developmental neurobiology* 69, 617-632.

Bibliografía

Sakagami, K., Gan, L., Yang, X.J., 2009. Distinct effects of Hedgehog signaling on neuronal fate specification and cell cycle progression in the embryonic mouse retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 29, 6932-6944.

Sanchez-Camacho, C., Bovolenta, P., 2008. Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135, 3531-3541.

Sanchez-Camacho, C., Bovolenta, P., 2009. Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *Bioessays* 31, 1013-1025.

Sanchez-Camacho, C., Rodriguez, J., Ruiz, J.M., Trousse, F., Bovolenta, P., 2005. Morphogens as growth cone signalling molecules. *Brain research. Brain research reviews* 49, 242-252.

Sanders, T.A., Llagostera, E., Barna, M., 2013. Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* 497, 628-632.

Sanek, N.A., Taylor, A.A., Nyholm, M.K., Grinblat, Y., 2009. Zebrafish *zic2a* patterns the forebrain through modulation of Hedgehog-activated gene expression. *Development* 136, 3791-3800.

Sanes, J.R., Masland, R.H., 2015. The Types of Retinal Ganglion Cells: Current Status and Implications for Neuronal Classification. *Annual review of neuroscience*.

Satoh, W., Gotoh, T., Tsunematsu, Y., Aizawa, S., Shimono, A., 2006. *Sfrp1* and *Sfrp2* regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133, 989-999.

Saxena, S., Caroni, P., 2007. Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Progress in neurobiology* 83, 174-191.

Schmitt, A.M., Shi, J., Wolf, A.M., Lu, C.C., King, L.A., Zou, Y., 2006. Wnt-Ryk signalling mediates medial-lateral retinotectal topographic mapping. *Nature* 439, 31-37.

Sebastian-Serrano, A., Sandonis, A., Cardozo, M., Rodriguez-Tornos, F.M., Bovolenta, P., Nieto, M., 2012. *Palphax6* expression in postmitotic neurons mediates the growth of axons in response to SFRP1. *PloS one* 7, e31590.

Seppala, M., Xavier, G.M., Fan, C.M., Cobourne, M.T., 2014. *Boc* modifies the spectrum of holoprosencephaly in the absence of *Gas1* function. *Biology open* 3, 728-740.

Shkumatava, A., Neumann, C.J., 2005. Shh directs cell-cycle exit by activating p57Kip2 in the zebrafish retina. *EMBO reports* 6, 563-569.

Stecca, B., Ruiz, I.A.A., 2010. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *Journal of molecular cell biology* 2, 84-95.

Stevens, A., Jacobs, J.R., 2002. Integrins regulate responsiveness to slit repellent signals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 4448-4455.

- Suh, L.H., Oster, S.F., Soehrman, S.S., Grenningloh, G., Sretavan, D.W., 2004. L1/Laminin modulation of growth cone response to EphB triggers growth pauses and regulates the microtubule destabilizing protein SCG10. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24, 1976-1986.
- Tamada, A., Kumada, T., Zhu, Y., Matsumoto, T., Hatanaka, Y., Muguruma, K., Chen, Z., Tanabe, Y., Torigoe, M., Yamauchi, K., Oyama, H., Nishida, K., Murakami, F., 2008. Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing. *Neural development* 3, 29.
- Tenzen, T., Allen, B.L., Cole, F., Kang, J.S., Krauss, R.S., McMahon, A.P., 2006. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Developmental cell* 10, 647-656.
- Terry, K., Magan, H., Baranski, M., Burrus, L.W., 2000. Sfrp-1 and sfrp-2 are expressed in overlapping and distinct domains during chick development. *Mechanisms of development* 97, 177-182.
- Thompson, H., Andrews, W., Parnavelas, J.G., Erskine, L., 2009. Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Developmental biology* 335, 418-426.
- Thompson, H., Barker, D., Camand, O., Erskine, L., 2006a. Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract. *Developmental biology* 296, 476-484.
- Thompson, H., Camand, O., Barker, D., Erskine, L., 2006b. Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 26, 8082-8091.
- Tian, N.M., Pratt, T., Price, D.J., 2008. Foxg1 regulates retinal axon pathfinding by repressing an ipsilateral program in nasal retina and by causing optic chiasm cells to exert a net axonal growth-promoting activity. *Development* 135, 4081-4089.
- Trousse, F., Marti, E., Gruss, P., Torres, M., Bovolenta, P., 2001. Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128, 3927-3936.
- van den Heuvel, M., Ingham, P.W., 1996. smoothened encodes a receptor-like serpentine protein required for hedgehog signalling. *Nature* 382, 547-551.
- van Horck, F.P., Weinl, C., Holt, C.E., 2004. Retinal axon guidance: novel mechanisms for steering. *Current opinion in neurobiology* 14, 61-66.
- Van Vactor, D., 1998. Adhesion and signaling in axonal fasciculation. *Current opinion in neurobiology* 8, 80-86.
- Wang, S.W., Mu, X., Bowers, W.J., Kim, D.S., Plas, D.J., Crair, M.C., Federoff, H.J., Gan, L., Klein, W.H., 2002. Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 129, 467-477.

Bibliografía

Wang, Y., Dakubo, G.D., Thurig, S., Mazerolle, C.J., Wallace, V.A., 2005. Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132, 5103-5113.

Webber, C.A., Hocking, J.C., Yong, V.W., Stange, C.L., McFarlane, S., 2002. Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22, 8091-8100.

Weber, S., Saftig, P., 2012. Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139, 3693-3709.

Williams, S.E., Mann, F., Erskine, L., Sakurai, T., Wei, S., Rossi, D.J., Gale, N.W., Holt, C.E., Mason, C.A., Henkemeyer, M., 2003. Ephrin-B2 and EphB1 Mediate Retinal Axon Divergence at the Optic Chiasm. *Neuron* 39, 919-935.

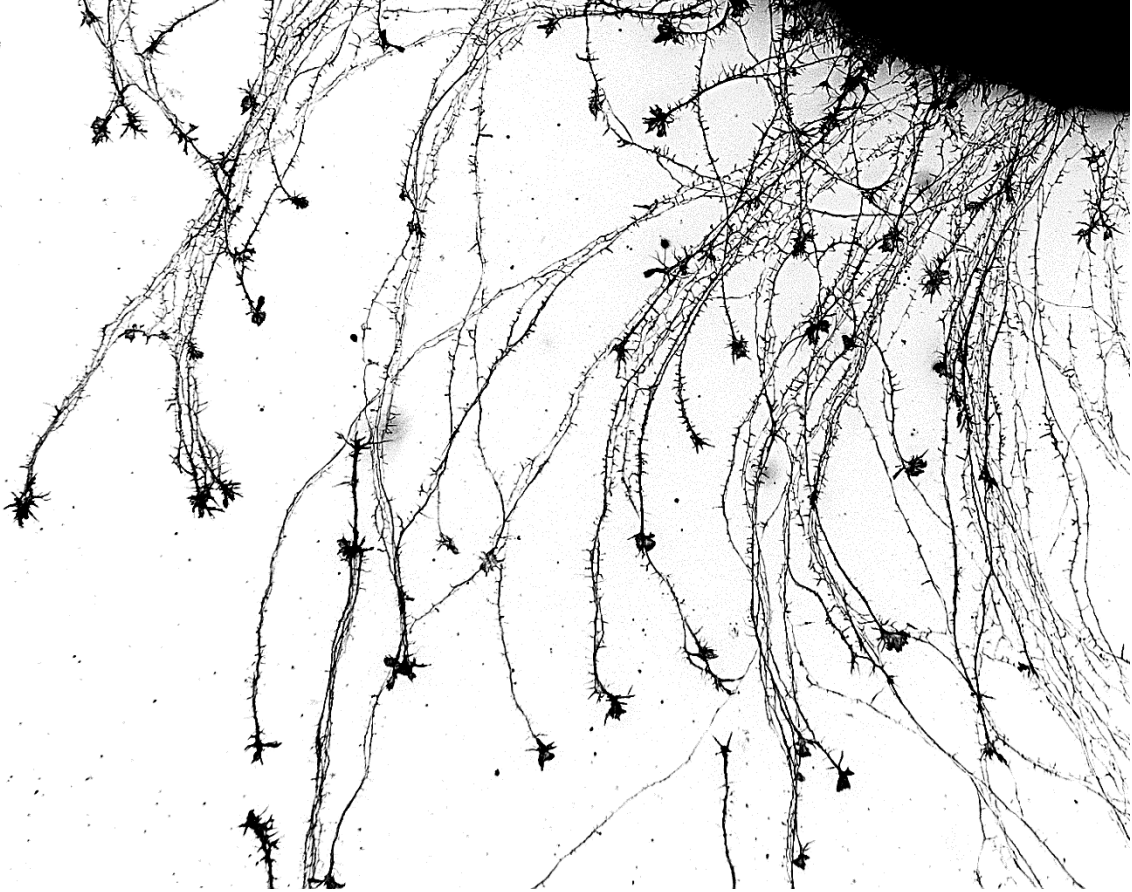
Yam, P.T., Langlois, S.D., Morin, S., Charron, F., 2009. Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* 62, 349-362.

Young, R.W., 1985. Cell differentiation in the retina of the mouse. *The Anatomical record* 212, 199-205.

Zhang, X.M., Yang, X.J., 2001a. Regulation of retinal ganglion cell production by Sonic hedgehog. *Development* 128, 943-957.

Zhang, X.M., Yang, X.J., 2001b. Temporal and spatial effects of Sonic hedgehog signaling in chick eye morphogenesis. *Developmental biology* 233, 271-290.

Apéndice





Molecules in focus

Cdon and Boc: Two transmembrane proteins implicated in cell–cell communication

Luisa Sanchez-Arrones¹, Marcos Cardozo¹, Francisco Nieto-Lopez, Paola Bovolenta*

Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, CSIC-UAM and CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), c/ Nicolás Cabrera, 1, Madrid 28049, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 December 2011

Received in revised form 20 January 2012

Accepted 27 January 2012

Available online 3 February 2012

Keywords:

Cell adhesion

IgG superfamily of CAMs

Hh signaling

Myoblast

ABSTRACT

Cdon and Boc, and their *Drosophila* homologues Ihog and Boi, are evolutionary conserved transmembrane glycoproteins belonging to a subgroup of the Immunoglobulin superfamily of cell adhesion molecules (CAMs). Initially isolated in vertebrates as CAMs that link cadherin function with MAPK signaling in myoblast differentiation, they have thereafter been shown to act as essential receptors for the Hedgehog (Hh) family of secreted proteins. They associate with both ligand and other Hh receptor components, including Ptch and Gas1, thus forming homo- and heteromeric complexes. In *Drosophila*, they are also involved in ligand processing and release from Hh producing cells. Cdon/Boc and Ihog/Boi can substitute one another and play redundant functions in some contexts. In addition, Boc, but not Cdon, mediates axon guidance information provided by Hh in specific neuronal populations, whereas mutations in the CDON cause holoprosencephaly, a human congenital anomaly defined by forebrain midline defects prominently associated with diminished Hh pathway activity.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Cell to cell communication is at the basis of coherent organ development and tissue homeostasis. There are several different ways in which cells interact with one another but cell adhesion and activation of signaling cascades by extracellular molecules are two prominent mechanisms. Cdon (cell adhesion molecule-related, down-regulated by oncogenes, also noted as Cdo) and Boc (Brother of Cdon), the two molecules here on focus, are emerging as important mediators of both functions.

The *Cdon* gene was isolated out of a screening designed to identify novel transformation suppressor genes using a cDNA library derived from a rat fibroblast cell line, resistant to oncogene-induced anchorage-independent growth (Kang et al., 1997). The corresponding gene product was characterized as a cell surface glycoprotein of the Immunoglobulin (Ig)/fibronectin type III-like (FNIII) family and soon after implicated in myogenic differentiation (Kang et al., 1998). Low stringency screening of a human fetal brain cDNA library with a rat *Cdon* probe lead to the identification of a related gene named *Boc*, which encoded a protein with similar effects on myoblast differentiation (Kang et al., 1998, 2002).

Both genes are highly conserved among vertebrates whereas, in the *Drosophila* counterparts, a high degree of conservation is found only in the region predicted to encode the extracellular domain (Kang et al., 2002). The *Drosophila* homologues were thereafter independently identified in a RNA interference screening in tissue culture cells for new components of the Hh signaling pathway and received the name of *ihog* (interference hedgehog) and *boi* (brother of ihog) (Lum et al., 2003). Both vertebrate and invertebrate proteins were shown to bind the N-terminal and biologically active Hh (HhN) or Shh (ShhN) peptides (Yao et al., 2006), prompting the investigation on *Cdo/Boc* and *ihog/boi* function in different directions.

2. Structure and interactions

The human *CDON* gene maps to the minus strand of a gene rich genomic region on chromosome 11q24.2 and is composed of 20 exons. Although data base predictions identify different alternative transcription start sites, only two transcripts have been so far described encoding isoforms of 1287 and 1264 aa. The shorter isoform has received the most attention. *BOC* similarly localizes to a gene-rich region but to the plus strand of chromosome 3q13.2. Its 20 exons encode an 1114 aa protein that shares 34% identity with *CDON* (Kang et al., 2002).

Cdon and Boc proteins have been characterized as cell surface glycoproteins belonging to a subgroup of the Immunoglobulin (Ig) superfamily of cell adhesion molecules (CAMs), that also includes the Robo axon-guidance receptors. Their ectodomain respectively contains five and four Ig-like domains, followed by three FNIII

* Corresponding author at: Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Universidad Autónoma de Madrid, c/ Nicolás Cabrera, 1, 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain. Tel.: +34 91 196 4718 (office); +34 91 196 4720 (lab); fax: +34 91 196 4420.

E-mail address: pbovolenta@cbm.uam.es (P. Bovolenta).

¹ These authors contributed equally to this work.

repeats (Fn1–3), a single trans-membrane domain and a divergent intracellular region of variable length (Fig. 1A), which may account for some of their functional differences (Kang et al., 2002; Mulieri et al., 2002). The presence of four Ig domains and only two FNIII repeats (Fn1, 2) distinguished the *Drosophila* Ihog and Boi from their vertebrate homologues (Fig. 1A) (Kang et al., 2002; Yao et al., 2006). Sequence analysis reveals that Cdon/Boc Fn2 and Fn3 are respectively homologous to the Fn1 and Fn2 of Ihog/Boi (Kang et al., 2002).

Boc and Cdon form homophilic and heterophilic complexes in cis by interaction of the ecto- and intracellular domains (Kang et al., 2002) (Fig. 1B–D). Cdon has also been shown to interact with Neogenin (Kang et al., 2004), an Ig/FNIII CAM family member that acts as receptor for the axon guidance cue Netrin. Furthermore, during myoblast and neuronal differentiation, cis-interaction of N-Cadherin with Fn1 (Kang et al., 2003; Lu and Krauss, 2010) promotes binding of the Cdon intracellular domain to Bnip-2 and JLP, two proteins that function as scaffolds for small GTPases and p38 pathway components, respectively (Kang et al., 2008; Takaesu et al., 2006; Oh et al., 2009). The Cdon–Bnip-2 complex further interacts with Cdc42 and stimulates its activity, which, in turn, is required for p38-dependent differentiation (Fig. 1B). Activation of the same pathway has been also observed after Cdon association with the non-receptor tyrosine kinase Abl (Bae et al., 2009) (Fig. 1B).

Cdon/Boc and Ihog/Boi bind members of the Hh family with high-affinity, but, notably, with different and evolutionary non-conserved modes (Okada et al., 2006; Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006; McLellan et al., 2008). Biochemical, biophysical, and X-ray structural studies demonstrated that Shh–Cdon interaction is calcium dependent and involves a previously unappreciated binuclear calcium-binding site on ShhN (McLellan et al., 2008) and the Cdon/Boc Fn3 (Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006; McLellan et al., 2008). This interaction mode is conserved for all vertebrate Hh proteins (Kavran et al., 2010). Instead, and despite the general extensive homology between invertebrate and vertebrate Hh proteins, the HhN surface that binds Ihog is different (a single common residue) from that implicated Shh/Cdon interaction (McLellan et al., 2008). Furthermore, HhN–Ihog binding is heparin-dependent and involves the Ihog/Boi Fn1, which is not homologous to the Cdon/Boc Fn3 (Yao et al., 2006) (Fig. 1A, B). The Cdon-like binding mode is

conserved in vertebrates and the Ihog-like mode in arthropods, but how interaction occurs in other species remains to be determined (McLellan et al., 2008).

Besides ligand binding, Ihog/Boi can form a complex with the Hh receptor Patched (Ptch) and this heteromeric interaction is required for both high-affinity ligand binding and presentation of Ptch at the cell surface, providing initial indications that Ihog or Boi are obligate co-receptors for efficient Hh reception (Zheng et al., 2010). This requirement is conserved in vertebrates (Fig. 1B, C), where an additional Hh binding protein, Gas1, can substitute Cdon or Boc function in specific contexts as demonstrated by genetic inactivation studies in mice (Bae et al., 2011; Izzi et al., 2011; Allen et al., 2011). Notably, Cdon has also been shown to associate with Gas1 (Fig. 1D).

The relevance of simultaneous interaction of Cdon/Boc with both ligand and other Hh receptor proteins is supported by mutation analysis. A mutation in Cdon that does not interfere with Shh binding, but weakens interaction with Ptch and Gas1, is associated with low Shh signaling activation (Bae et al., 2011). Conversely, a point mutation in the Hh protein that interferes with Boc, Cdon and Gas1 but not with Ptch binding prevents Shh signaling activation (Izzi et al., 2011).

3. Expression, activation and turnover

Boc and Cdon mRNAs were initially localized to cells of the myogenic lineages (Kang et al., 1998, 2002; Mulieri et al., 2002) but their distribution has been thereafter detected from gastrulation stages in many tissues of different vertebrate species. In general, their expression is mostly associated to domains of proliferating and undifferentiated cells where both genes are co-expressed, indicating cooperative activities (Mulieri et al., 2002). Both genes have also unique sites of expression that may explain the so far specific function of Boc (Connor et al., 2005; Fabre et al., 2010; Okada et al., 2006) and Cdon (Ming et al., 1998; Cole and Krauss, 2003) as we will detail later. In *Drosophila*, *ihog* and *boi* are widely distributed at embryonic and larva L3 stages (<http://flybase.org>).

At early stages of vertebrate embryonic development, Boc and Cdon are abundantly expressed in the head folds, somites, the developing lungs, primitive gut and tracheal mesenchyme, the

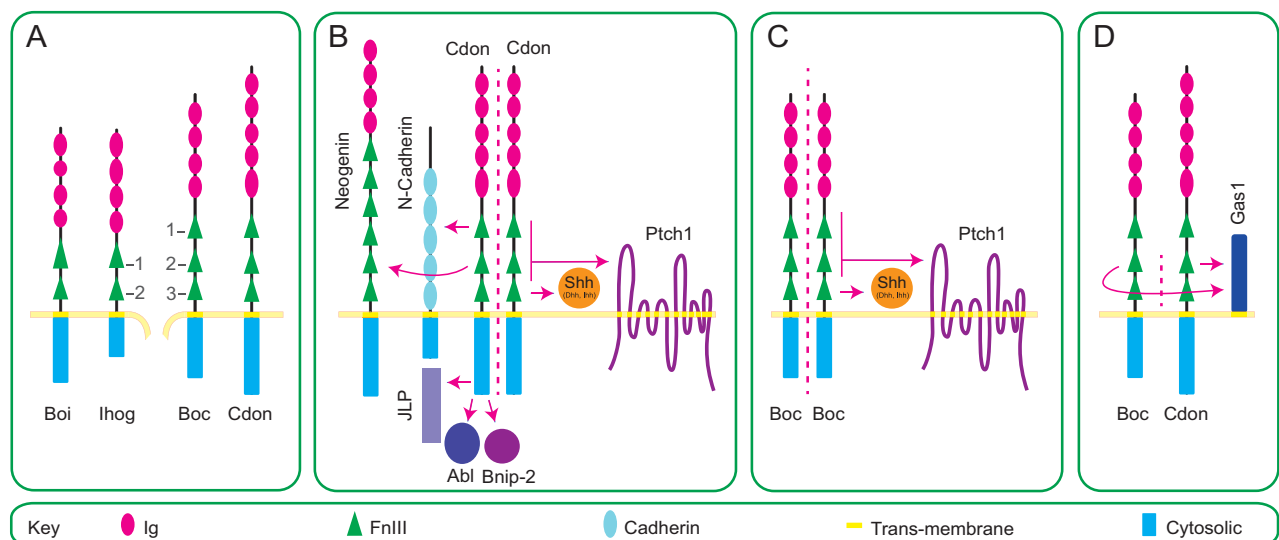


Fig. 1. Schematic diagram representing the structure and protein interactions of Boc and Cdon. (A) Comparison of the domain organization of Boc and Cdon with that of their *Drosophila* homologs, Boi and Ihog. Numbers indicate the position of each Fibronectin type III (FNIII) domain. (B) Cdon forms homo- and heteromeric complexes binding to Neogenin and N-cadherin and interacts with the cytosolic proteins JLP, Abl, Bnip-2. Within the Shh signaling pathways Cdon (B) and Boc (C) associate with Shh, Dhh, Ihh and Ptch1. (D) Boc and Cdon can interact in cis and bind Gas1. Arrows and dotted lines depict protein interactions. Ig, Immunoglobulin domain. FNIII, Fibronectin type III domain.

digestive tract and urogenital system, the limb buds, the dorsal aspect of the entire neural tube and sensory organs, including the inner ear, the olfactory apparatus and the developing eye (Kang et al., 2002; Mulieri et al., 2000, 2002; Connor et al., 2005; McGlinn et al., 2005; Bergeron et al., 2011). Later on, Boc and Cdon have been also detected in the cortical progenitors of the telencephalon, the prospective hippocampus, the dorsal thalamus and epithalamus and the dorsal superior and inferior coliculi (Aglyamova and Agarwala, 2007).

In mice *Cdon* mRNA is also transiently expressed at low levels in the notochord (Tenzen et al., 2006), whereas *Boc* has been transiently detected in the zebrafish ventral spinal cord prior to expression in the dorsal neural tube, in the branchial arches and in the hypothalamus and hindbrain (Bergeron et al., 2011). As the central nervous system develops, Boc, but not Cdon, localizes to the differentiated commissural neurons of the spinal cord (Okada et al., 2006; Tenzen et al., 2006) and to the ipsilaterally projecting retinal ganglion cells (RGCs) (Fabre et al., 2010; Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008), influencing the axon outgrowth of both types of neurons.

At the moment there is little information regarding the precise regulation of *Cdon/Boc* and *ihog/boi* expression and the turnover of the respective encoded proteins. *Cdon* and *Boc* both seem to be negatively regulated by Hh signaling in early vertebrate embryos (Tenzen et al., 2006; Bergeron et al., 2011) as also supported by the abnormal levels of *Cdon* expression found in the limb buds of *Gli3* mutant embryos (McGlinn et al., 2005). However, there is also evidence for Shh-mediated *Boc* upregulation in cerebellar granule cell precursors (Lee et al., 2010). Nevertheless, the final levels of receptors at the membrane might be tightly regulated by a complex feed-back regulatory mechanism as in both vertebrates and invertebrates *Cdo/Boc* and *ihog/boi* participate in Hh pathway activation (Lum et al., 2003; Okada et al., 2006; Tenzen et al., 2006; Yao et al., 2006; Izzi et al., 2011; Allen et al., 2011) and regulate the extracellular Hh distribution, likely restricting its range of action (Yan et al., 2010; Hartman et al., 2010; Callejo et al., 2011) (Fig. 2A).

4. Biological functions

As already mentioned, *Cdon/Boc* and *ihog/Boi* are cell adhesion molecules and important regulators of Hh signaling in different contexts. As such, they have been shown to regulate different developmental and homeostatic events with Hh-independent and dependent mechanisms. The studies exploring the function of both proteins in different species are rapidly growing. Below we highlight a few prominent aspects of their activities.

Specification and differentiation of skeletal myocytes are tightly regulated and require the activity of transcription factors such as myogenic regulatory factors (MRF) and myocyte enhance factor-2 (MEF2). MRF and MEF2 are in turn controlled by the p38 α / β mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and p38 α deficiency impairs myoblast differentiation (Krauss, 2010). Cell adhesion mediated by cadherins, including N-, R- and M-cadherins, is also a key factor in skeletal muscle differentiation (Krauss, 2010). *Cdon* acts at the interface between these two events. As mentioned above, *Cdon* associates at the plasma membrane with N- and M-cadherins. Upon interaction, the intracellular region of *Cdon* undergoes a change and stably associates with Bnip-2/Cdc42 and JLP/p38 α / β , leading to p38 activation and thus myogenic differentiation (Fig. 1B). These changes do not occur when *Cdon* binds Shh, thus *Cdon* acts as a non-ligand-binding signaling co-receptor for N-cadherin in this context (Lu and Krauss, 2010). Similarly, *Cdon* associates with Neogenin, and both molecules are required for Netrin-mediated activation of FAK and ERK signaling in myoblasts (Bae et al., 2009). In line with these multiple functions, *Cdon*^{-/-} mice present delayed skeletal muscle development (Cole et al., 2004).

Cdon, *Boc*, Cadherins and Neogenin are co-expressed in different tissues, but whether their functional interaction is muscle specific or occurs in other tissues needs to be explored. Indeed, most of the currently known, additional functions of *Cdon* and *Boc* can be explained by their participation in the Hh signaling pathway, forming a functional receptor with *Ptch* in several tissues and/or

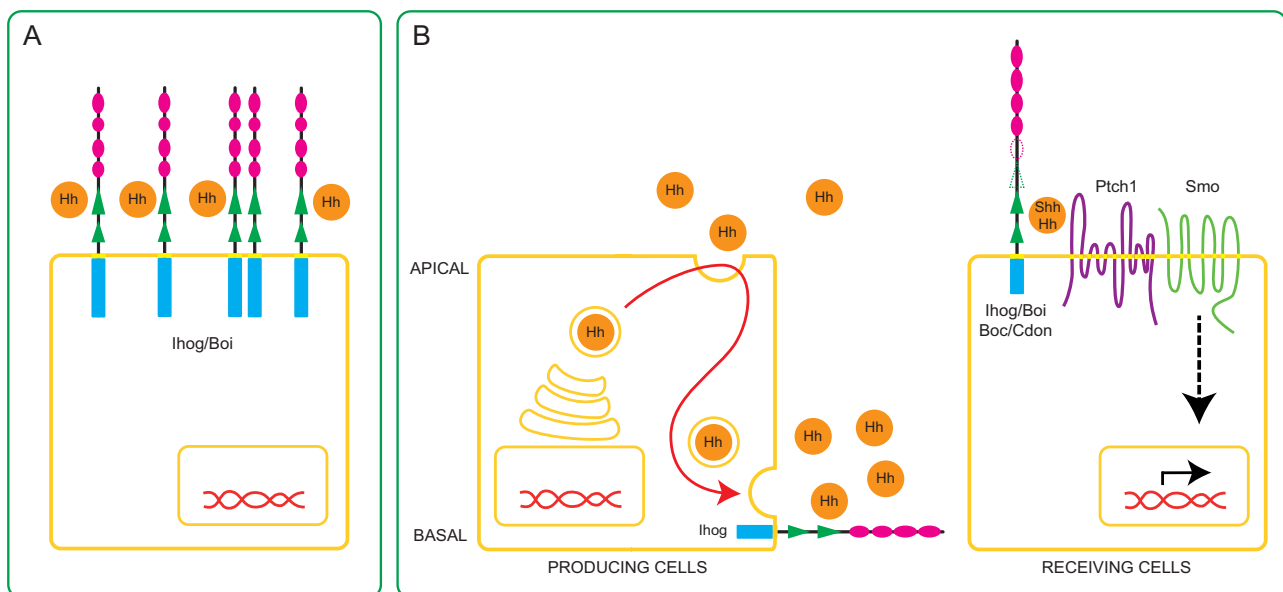


Fig. 2. Schematic diagram of the proposed functions for *Cdon/Boc* and *Ihog/Boi* in the Hh signaling. (A) *Ihog* and *Boi* can titrate Hh levels in the extracellular space, acting as molecular sinks. (B) In the Hh producing cell, Hh undergoes apico-basal recycling in the wing imaginal disc epithelium. *Ihog* in the latero-basal membrane contributes to processes of Hh release and membrane attachment. In the receiving cell, *Ihog*, *Boi*, *Boc* and *Cdon* associate with both Hh ligands and Patched (*Ptch*) receptor increasing the Hh signaling response. Pathways activation further involves release of Smoothened (*Smo*) inhibition and transcription activation of target genes.

cell types (Fig. 2B). Notably, their function appears redundant in different contexts. For example, Boc and Gas1 can substitute one another in the cerebellum and both of them can associate with the Ptch receptor to mediate Shh-dependent proliferation of cerebellar granule neuron progenitors. Consequently, only combined genetic inactivation of the two molecules impairs cerebellar development (Izzi et al., 2011). Similarly, Boc, Gas1 as well as Cdon play overlapping and essential roles during early Hh-dependent patterning of the mammalian ventral neural tube and further contribute to the specification of different neural progenitors (Allen et al., 2011). Only embryos deficient in the three genes die before birth and are characterized by a phenotype similar to that in *Shh* null embryos, with severe holoprosencephaly (HPE) – a phenotype defined by forebrain midline defects – cyclopia, heart and limb malformations (Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011). This overlapping activity does not seem to be conserved in zebrafish, where loss of Boc function, that characterizes the *umleitung* (*uml*) mutant, is sufficient to cause defects in patterning of the ventral neural tube, somites and upper jaw. Mechanistically, Boc seems required to maximize the response of cells exposed to high Hh concentrations; in its absence, cells no longer express genes that are normally activated by high Hh levels (Bergeron et al., 2011).

Boc, but not Cdon, has also been implicated in mediating axon guidance information provided by Shh. Both spinal cord commissural and RGC axons respond to Shh secreted by ventral midline cells, the floor plate and the pre- and post-optic areas, respectively. Their response is however different. Floor plate-derived Shh attracts Boc-positive commissural axons from the dorsal spinal cord toward the midline, whereas the growth of contralateral projecting RGC axons is suppressed by Shh, which, expressed at the chiasm borders, funnels the growth of axons to the contralateral side of the brain (rev. in Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2009). Genetic inactivation of *Boc* prevents commissural axons to reach the floor plate (Okada et al., 2006), with a mechanism that seems to involve a Src-kinase dependent non-canonical pathway (Yam et al., 2009). In contrast to commissural neurons, contralaterally projecting RGCs do not express *Boc*, suggesting that Shh-mediated repulsion involves a different receptor complex. Notably however, *Boc* localizes to the small population of ipsilaterally projecting RGCs, the axons of which respond positively to Shh stimulation (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008). In *Boc* null embryos, the number of ipsilateral projecting axons is reduced, leading to the hypothesis that Boc contributes to the segregation visual axons at the optic chiasm (Fabre et al., 2010). Further supporting that *Boc* has a relevant function in axon guidance, knock-down of *Boc* function in zebrafish causes defects in the trajectory of the dorso-ventrally projecting supraoptic and epiphyseal tracts, which aberrantly grow toward the anterior and postoptic commissure, respectively. In addition, axons of the posterior commissure were defasciculated and ectopically extended toward rostro-dorsal regions (Connor et al., 2005). Whether all these defects are Hh-dependent or may alternatively imply the cell adhesion properties of Boc needs to be investigated.

In contrast to *Boc*^{−/−} mice that are characterized by axon guidance defects, *Cdon* deficient mice display different forms of HPE with strain-specific severity that goes from mild facial defects to brain and eye malformations (Cole and Krauss, 2003; Zhang et al., 2006, 2009), suggesting that Cdon has some spatio-temporal unique function during embryonic development. Underscoring a unique function during mammalian development, mutations in *CDON* have been found in patients affected by HPE (Bae et al., 2011). Nevertheless, defects of *Cdon*^{−/−} embryos aggravate in absence of *Boc*. Indeed, *Cdo*^{−/−};*Boc*^{−/−} animals display severe brain defects and strong craniofacial anomalies, associated to reduced expression of *Shh* and its target genes (Zhang et al., 2011). The phenotype of double-mutant mice is however milder than that of *Shh*-null mice,

likely owing to the compensating expression of Gas1 (Allen et al., 2011; Izzi et al., 2011).

In *Drosophila*, loss of either *boi* or *ihog* function has no consequences in the development of the imaginal discs that are normally strongly dependent on Hh signaling. Their combined inactivation however recapitulates *hh* loss of function, suggesting that Boi and Ihog play a redundant function in Hh pathway activation (Zheng et al., 2010; Camp et al., 2010). Notably, Ihog and Boi have been also related to the formation of the Hh gradient, as both proteins can sequester and titrate the amount of ligand available for Ptch binding, thus limiting long-range signaling (Yan et al., 2010; Zheng et al., 2010; Hartman et al., 2010).

As in vertebrates, specific independent functions for Ihog and Boi have been also described. Indeed, Boi, but not Ihog, is expressed in apical cells of the *Drosophila* ovary where it suppresses follicle stem cell proliferation by binding to and sequestering Hh on the apical cell surface, thereby controlling Hh long-range distribution (Hartman et al., 2010). Ihog instead together with Dally-like (Dlp), an additional protein previously implicated in Hh reception, has been shown to act as a key component of Hh secretion from the producing cells (Fig. 2B). Ihog and Dlp both interact with Ptc during Hh reception (Yao et al., 2006; Yan et al., 2010) and both interact with Dispatched during Hh release from the producing cells (Callejo et al., 2011). In the *Drosophila* wing imaginal disc epithelium, Hh undergoes apico-basal recycling in the producing cells to form a basolateral gradient. Ihog anchors Hh to the basolateral plasma membranes, where it binds to Ptch localized to the baso-lateral side of the responding cells and activates the downstream signaling cascade (Callejo et al., 2011). Whether Boi has a similar role and what makes Ihog acquire different functions in the producing and receiving cells are still unanswered questions that deserve attention.

5. Possible medical applications

Mutations in *CDON* have already been associated with human HPE and *BOC* may represent a silent HPE modifier gene (Zhang et al., 2011). However, besides HPE, alterations in Shh signaling cause other severe pathological conditions including Carpenter, Ellis-van Creveld, Smith-Lemli-Opitz and Pallister-Hall Diseases, Greig Cephalopolysyndactyly or the Gorlin syndrome. Search for possible implications of Cdon and Boc in these conditions is thus a necessary step toward the understanding of the possible medical implication of these molecules. The important role of Cdon in eye formation and that of Boc in RGC axon guidance are also reasons to consider these genes as possible candidates for inborn ocular malformations. The fundamental role of Cdon and Boc in Hh signaling suggests also that they might be relevant targets for therapy in Hh dependent tumors.

Acknowledgments

We are in debt with Prof. Isabel Guerrero for helpful discussion and critical reading of the manuscript. Work in our laboratory is supported by grants from the Spanish MICINN (BFU2010-16031), Comunidad Autonoma de Madrid (CAM, P-SAL-0190-2006), Fundación ONCE, Fundaluce and CIBERER to P.B. and by an Institutional Grant from the Fundación Ramon Areces. LSA, MC and FN are supported by a postdoctoral contract from the CSIC (JAEDOC-012), and predoctoral contracts from the MICINN (BES-2008-005457) and (AP2009-0349), respectively.

References

- Aglyamova GV, Agarwala S. Gene expression analysis of the hedgehog signaling cascade in the chick midbrain and spinal cord. *Developmental Dynamics* 2007;236:1363–73.

- Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, et al. Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Developmental Cell* 2011;20:775–87.
- Bae GU, Domene S, Roessler E, Schachter K, Kang JS, Muenke M, et al. Mutations in CDON, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *American Journal of Human Genetics* 2011;89:231–40.
- Bae GU, Kim BG, Lee HJ, Oh JE, Lee SJ, Zhang W, et al. Cdo binds Abl to promote p38alpha/beta mitogen-activated protein kinase activity and myogenic differentiation. *Molecular and Cellular Biology* 2009;29:4130–43.
- Bergeron SA, Tyurina OV, Miller E, Bagas A, Karlstrom RO. Brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish. *Development* 2011;138:75–85.
- Callejo A, Bilioni A, Mollica E, Gorfinkel N, Andres G, Ibanez C, et al. Dispatched mediates Hedgehog basolateral release to form the long-range morphogenetic gradient in the Drosophila wing disk epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011;108:12591–8.
- Camp D, Currie K, Labbe A, van Meyel DJ, Charron F. Ihog and Boi are essential for Hedgehog signaling in Drosophila. *Neural Development* 2010;5:28.
- Cole F, Krauss RS. Microform holoprosencephaly in mice that lack the Ig superfamily member Cdon. *Current Biology* 2003;13:411–5.
- Cole F, Zhang W, Geyra A, Kang JS, Krauss RS. Positive regulation of myogenic bHLH factors and skeletal muscle development by the cell surface receptor CDO. *Developmental Cell* 2004;7:843–54.
- Connor RM, Allen CL, Devine CA, Claxton C, Key B. BOC, brother of CDO, is a dorsoventral axon-guidance molecule in the embryonic vertebrate brain. *Journal of Comparative Neurology* 2005;485:32–42.
- Fabre PJ, Shimogori T, Charron F. Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *Journal of Neuroscience* 2010;30:266–75.
- Hartman TR, Zinshteyn D, Schofield HK, Nicolas E, Okada A, O'Reilly AM. Drosophila Boi limits Hedgehog levels to suppress follicle stem cell proliferation. *The Journal of Cell Biology* 2010;191:943–52.
- Izzi L, Levesque M, Morin S, Laniel D, Wilkes BC, Mille F, et al. Boc and Gas1 each form distinct Shh receptor complexes with Ptch1 and are required for Shh-mediated cell proliferation. *Developmental Cell* 2011;20:788–801.
- Kang JS, Bae GU, Yi MJ, Yang YJ, Oh JE, Takaesu G, et al. A Cdo-Bnlp-2-Cdc42 signaling pathway regulates p38alpha/beta MAPK activity and myogenic differentiation. *The Journal of Cell Biology* 2008;182:497–507.
- Kang JS, Feinleib JL, Knox S, Ketteringham MA, Krauss RS. Promyogenic members of the Ig and cadherin families associate to positively regulate differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:3989–94.
- Kang JS, Gao M, Feinleib JL, Cotter PD, Guadagno SN, Krauss RS. CDO: an oncogene-, serum-, and anchorage-regulated member of the Ig/fibronectin type III repeat family. *The Journal of Cell Biology* 1997;138:203–13.
- Kang JS, Mulieri PJ, Hu Y, Taliana L, Krauss RS. BOC, an Ig superfamily member, associates with CDO to positively regulate myogenic differentiation. *EMBO Journal* 2002;21:114–24.
- Kang JS, Mulieri PJ, Miller C, Sassoon DA, Krauss RS. CDO, a robo-related cell surface protein that mediates myogenic differentiation. *The Journal of Cell Biology* 1998;143:403–13.
- Kang JS, Yi MJ, Zhang W, Feinleib JL, Cole F, Krauss RS. Netrins and neogenin promote myotube formation. *The Journal of Cell Biology* 2004;167:493–504.
- Kavran JM, Ward MD, Oladosu OO, Mulepati S, Leahy DJ. All mammalian Hedgehog proteins interact with cell adhesion molecule, down-regulated by oncogenes (CDO) and brother of CDO (BOC) in a conserved manner. *Journal of Biological Chemistry* 2010;285:24584–90.
- Krauss RS. Regulation of promyogenic signal transduction by cell–cell contact and adhesion. *Experimental Cell Research* 2010;316:3042–9.
- Lee EY, Ji H, Ouyang Z, Zhou B, Ma W, Vokes SA, et al. Hedgehog pathway-regulated gene networks in cerebellum development and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:9736–41.
- Lu M, Krauss RS. N-cadherin ligation, but not Sonic hedgehog binding, initiates Cdo-dependent p38alpha/beta MAPK signaling in skeletal myoblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:4212–7.
- Lum L, Yao S, Mozer B, Rovescalli A, Von Kessler D, Nirenberg M, et al. Identification of Hedgehog pathway components by RNAi in Drosophila cultured cells. *Science* 2003;299:2039–45.
- McGlinn E, van Bueren KL, Fiorenza S, Mo R, Poh AM, Forrest A, et al. Pax9 and Jagged1 act downstream of Gli3 in vertebrate limb development. *Mechanisms of Development* 2005;122:1218–33.
- McLellan JS, Zheng X, Hauk G, Ghirlando R, Beachy PA, Leahy DJ. The mode of Hedgehog binding to Ihog homologues is not conserved across different phyla. *Nature* 2008;455:979–83.
- Ming JE, Roessler E, Muenke M. Human developmental disorders and the Sonic hedgehog pathway. *Molecular Medicine Today* 1998;4:343–9.
- Mulieri PJ, Kang JS, Sassoon DA, Krauss RS. Expression of the boc gene during murine embryogenesis. *Developmental Dynamics* 2002;223:379–88.
- Mulieri PJ, Okada A, Sassoon DA, McConnell SK, Krauss RS. Developmental expression pattern of the cdo gene. *Developmental Dynamics* 2000;219:40–9.
- Oh JE, Bae GU, Yang YJ, Yi MJ, Lee HJ, Kim BG, et al. Cdo promotes neuronal differentiation via activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway. *The FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2009;23:2088–99.
- Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, et al. Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 2006;444:369–73.
- Sanchez-Camacho C, Bovolenta P. Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 2008;135:3531–41.
- Sanchez-Camacho C, Bovolenta P. Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 2009;31:1013–25.
- Takaesu G, Kang JS, Bae GU, Yi MJ, Lee CM, Reddy EP, et al. Activation of p38alpha/beta MAPK in myogenesis via binding of the scaffold protein JLP to the cell surface protein Cdo. *The Journal of Cell Biology* 2006;175:383–8.
- Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP. The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Developmental Cell* 2006;10:647–56.
- Yam PT, Langlois SD, Morin S, Charron F. Sonic hedgehog guides axons through a noncanonical, Src-family-kinase-dependent signaling pathway. *Neuron* 2009;62:349–62.
- Yan D, Wu Y, Yang Y, Belenkaya TY, Tang X, Lin X. The cell-surface proteins Dally-like and Ihog differentially regulate Hedgehog signaling strength and range during development. *Development* 2010;137:2033–44.
- Yao S, Lum L, Beachy P. The ihog cell-surface proteins bind Hedgehog and mediate pathway activation. *Cell* 2006;125:343–57.
- Zhang W, Hong M, Bae GU, Kang JS, Krauss RS. Boc modifies the holoprosencephaly spectrum of Cdo mutant mice. *Disease Models & Mechanisms* 2011;4:368–80.
- Zhang W, Kang JS, Cole F, Yi MJ, Krauss RS. Cdo functions at multiple points in the Sonic Hedgehog pathway, and Cdo-deficient mice accurately model human holoprosencephaly. *Developmental Cell* 2006;10:657–65.
- Zhang W, Mulieri PJ, Gaio U, Bae GU, Krauss RS, Kang JS. Ocular abnormalities in mice lacking the immunoglobulin superfamily member Cdo. *The FEBS Journal* 2009;276:5998–6010.
- Zheng X, Mann RK, Sever N, Beachy PA. Genetic and biochemical definition of the Hedgehog receptor. *Genes & Development* 2010;24:57–71.

Sox2 is required for embryonic development of the ventral telencephalon through the activation of the ventral determinants Nkx2.1 and Shh

Anna Ferri¹, Rebecca Favaro^{1,*}, Leonardo Beccari^{2,3,*}, Jessica Bertolini¹, Sara Mercurio¹, Francisco Nieto-Lopez^{2,3}, Cristina Verzeroli¹, Federico La Regina⁴, Davide De Pietri Tonelli⁵, Sergio Ottolenghi¹, Paola Bovolenta^{2,3} and Silvia K. Nicolis^{1,‡}

SUMMARY

The Sox2 transcription factor is active in stem/progenitor cells throughout the developing vertebrate central nervous system. However, its conditional deletion at E12.5 in mouse causes few brain developmental problems, with the exception of the postnatal loss of the hippocampal radial glia stem cells and the dentate gyrus. We deleted Sox2 at E9.5 in the telencephalon, using a Bf1-Cre transgene. We observed embryonic brain defects that were particularly severe in the ventral, as opposed to the dorsal, telencephalon. Important tissue loss, including the medial ganglionic eminence (MGE), was detected at E12.5, causing the subsequent impairment of MGE-derived neurons. The defect was preceded by loss of expression of the essential ventral determinants Nkx2.1 and Shh, and accompanied by ventral spread of dorsal markers. This phenotype is reminiscent of that of mice mutant for the transcription factor Nkx2.1 or for the Shh receptor Smo. Nkx2.1 is known to mediate the initial activation of ventral telencephalic Shh expression. A partial rescue of the normal phenotype at E14.5 was obtained by administration of a Shh agonist. Experiments in Medaka fish indicate that expression of Nkx2.1 is regulated by Sox2 in this species also. We propose that Sox2 contributes to Nkx2.1 expression in early mouse development, thus participating in the region-specific activation of Shh, thereby mediating ventral telencephalic patterning induction.

KEY WORDS: Brain development, Sox2, Ventral telencephalon, Mouse, Neurogenesis, Sonic hedgehog, Nkx2.1

INTRODUCTION

The transcription factor Sox2 is necessary for the maintenance of pluripotency in epiblast and embryonic stem cells; its knockout is early embryonic lethal (Avilion et al., 2003; Masui et al., 2007). Later in development, Sox2 is required in various tissue stem cells and early progenitors, in particular in the nervous system (Que et al., 2009; Basu-Roy et al., 2010; Pevny and Nicolis, 2010). Throughout vertebrate evolution, Sox2 is expressed in the developing neuroectoderm from its earliest stages (Wegner and Stolt, 2005). In the embryonic nervous system, Sox2 marks undifferentiated neural precursor cells, including neural stem cells (NSCs). Postnatally, Sox2 is expressed in NSCs within the neurogenic niches of the subventricular zone (SVZ) and hippocampus dentate gyrus (DG) (Zappone et al., 2000; Ellis et al., 2004; Ferri et al., 2004; Suh et al., 2007). Sox2 is also expressed in some differentiating neural cells and neurons (Ferri et al., 2004; Taranova et al., 2006; Cavallaro et al., 2008).

Interestingly, heterozygous Sox2 mutations in humans cause a characteristic spectrum of CNS abnormalities, including eye, hippocampus, hypothalamus and basal ganglia defects, with neurological pathology including epilepsy and motor control

problems (Fantès et al., 2003; Kelberman et al., 2008; Sisodiya et al., 2006).

Sox2 gain-of-function and dominant-negative experiments established roles for Sox2 in the maintenance of NSC/progenitor cells in chicken and frog (Kishi et al., 2000; Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003). Moreover, neonatal and embryonic NSCs grown *in vitro* from mice with a nestin-Cre-driven conditional ablation of Sox2 in the neural tube at embryonic day of development (E) 12.5 became prematurely exhausted in long-term culture experiments (Favaro et al., 2009).

Despite the severe *in vitro* defects of NSC maintenance, *in vivo* embryonic brain abnormalities in Sox2-nestin-Cre mutants are rather limited (Miyagi et al., 2008; Favaro et al., 2009); the only prominent defect is early postnatal failure to maintain hippocampal NSCs (radial glia) and neurogenesis, followed by loss of the hippocampal dentate gyrus. These defects were preceded by embryonic-perinatal loss of sonic hedgehog (Shh) expression in the telencephalon (but not in midbrain and in spinal cord), and could be rescued by a chemical Shh agonist (Favaro et al., 2009).

The reasons for the limited effects of Sox2 deletion on brain development remain unclear. Other Sox proteins, such as Sox1 and Sox3, which play roles similar to those of Sox2 (Bylund et al., 2003; Graham et al., 2003), might compensate *in vivo* for Sox2 absence. Alternatively, the timing of embryonic Sox2 deletion in previous experiments (Favaro et al., 2009) might have been too late, thus failing to uncover essential earlier functions of Sox2.

Here, we have used an early-acting Bf1 (Foxg1)-Cre transgene, which completely ablated Sox2 by E9.5 in the developing telencephalon, two days earlier than the deletion with nestin-Cre (Miyagi et al., 2008; Favaro et al., 2009). This caused defects much more severe than those observed with nestin-Cre (Miyagi et al.,

¹Dipartimento di Biotecnologie e Bioscienze, Università di Milano-Bicocca, piazza della Scienza 2, 20126 Milan, Italy. ²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM and ³CIBER de Enfermedades Raras (CIBERER), c/Nicolás Cabrera, 1 28049 Cantoblanco, Madrid, Spain. ⁴European Brain Research Institute (EBRI Rita Levi-Montalcini), via del Fosso Fiorano, 64 Rome, Italy. ⁵Italian Institute of Technology, via Morego 30, 16163 Genova, Italy.

*These authors contributed equally to this work

‡Author for correspondence (silvia.nicolis@unimib.it)

2008; Favaro et al., 2009). Unexpectedly, these defects were markedly region specific, with much more pronounced ventral than dorsal telencephalic alterations. The medial ganglionic eminence (MGE) was completely lost at E12.5, preceded by an earlier failure to express the ventral determinants *Nkx2.1* (*Nkx2-1*) and *Shh*. Treatment with a *Shh* agonist (*Shh-ag*) *in vivo* was sufficient to rescue the ventral (MGE) phenotype to a significant, but not complete, extent. Furthermore, we show that *Sox2* regulates *Nkx2.1*, a known direct activator of *Shh* (Jeong et al., 2006).

MATERIALS AND METHODS

Mouse strains

Sox2^{flox/+} mice (Favaro et al., 2009) were bred to *Bfl-Cre* mice (Hébert and McConnell, 2000) to obtain compound *Sox2^{flox/+} Bfl-Cre* heterozygotes, which were bred to *Sox2^{flox/flox}* mice to generate *Sox2*-deleted embryos. *Bfl-Cre* mice were maintained by brother-sister mating, and subsequently on a 129 background (Hébert and McConnell, 2000).

Histology, *in situ* hybridisation (ISH), immunohistochemistry and *Shh* agonist treatment

Histology, ISH and immunohistochemistry were carried out as previously described (Ferri et al., 2004; Favaro et al., 2009). Antibodies used were: anti-SOX2, anti-SOX1, anti-SOX3, anti-SOX9 mouse monoclonals (R&D Systems); anti-*Nkx2.1* rabbit polyclonal (BIOPAT); anti-SHH rabbit polyclonal (Santa Cruz); and anti-SHH mouse monoclonal [Developmental Studies Hybridoma Bank (DSHB)]. BrdU (Sigma B5002, 15 mg/ml in PBS) was administered to pregnant females at 6 µl/g body weight; females were sacrificed after 30 minutes. BrdU immunofluorescence and TUNEL analysis were carried out as described by Favaro et al. (Favaro et al., 2009) and Ferri et al. (Ferri et al., 2004), respectively.

Shh agonist #1.2 (Frank-Kamenetsky et al., 2002) was administered to pregnant females at E8.5 and E10.5, by oral gavage of a 1.5 mg/ml solution in 0.5% methylcellulose/0.2% Tween 80 at 100 µl/g body weight.

Mosaic deletion of *Sox2* by *Sox2CreERT2* was by tamoxifen administration at E8.5 by oral gavage of a 20 mg/ml solution in 1:10 ethanol/corn oil, 0.1 mg/g body weight (Favaro et al., 2009).

Nkx2.1 regulation studies

Transgenic constructs

The genomic sequence spanning nucleotides −495 to +1842 relative to the mouse upstream *Nkx2.1* transcription start site was PCR amplified (primers: forward: 5'-GAGTAGAGAGCACTCTTCAAGGAG-3'; reverse: 5'-GGCGTCGGCTGGAGGAGGAAGGAAG-3') and cloned into the vector *Iscel-EGFP* (Conte and Bovolenta, 2007) generating *mNkx2.1 wt long:EGFP*. The *Sox2* consensus sites were mutated using the Multisite Quickchange Lightening Kit (Strataclone).

Luciferase constructs

Appropriate fragments were amplified by PCR (with primers: forward: 5'-ATCTCGAGCCGACCAAATTGGACCGCGG-3', added *XhoI* site underlined; reverse: 5'-GCGAGATCTTGCCAAATATTCTGGTGT-ACCTTAACG-3', added *BglII* site underlined) and cloned upstream to the luciferase gene into the TK-LUC vector (provided by A. Okuda, Saitama Medical School, Saitama, Japan) previously deleted of the TK minimal promoter.

Chromatin immunoprecipitation (ChIP)

ChIP was performed using stage 16–18 Medaka fish (*Oryzias latipes*) embryos. Chromatin was immunoprecipitated with 2 µg of anti-*Sox2* (R&D Systems) or a non-related IgG (Sigma). DNA was analysed by Q-PCR (Roche). Fold-enrichment was expressed as the ratio of *Sox2* to IgG signal. Q-PCR of the 18S rRNA region and the 3' UTR of the *Nkx2.1* gene, lacking *Sox2*-binding consensus (negative controls), and of the *Nkx2.1* promoter/enhancer, were performed using the following specific primers: 18S Forward: 5'-GGTAACCCGCTGAACCCAC-3'; 18S Reverse: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'; *Nkx2.1*-3'UTR Forward: 5'-GCCCTACAGGTTTCAGTCCAG-3'; *Nkx2.1*-3'UTR Reverse: 5'-ACTGGGACTGGGGTTCTTTT-3'; *Nkx2.1*enhancer Forward: 5'-CAATTAAG-

GCGGACTTGAGG-3'; *Nkx2.1*enhancer Reverse: 5'-AGAAGGCAAGGCAATCTCTC-3'.

Transfection experiments

P19 cells (2×10^5 /well) were plated in 6-well plates and transfected after 24 hours in 1 ml of Opti-MEM (Invitrogen) with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with 1 µg luciferase plasmid (*Nkx2.1*-luciferase, or 'empty'-luciferase), and increasing amounts of *Sox2* expression vector (Favaro et al., 2009). In control experiments, equimolar amounts of *Sox2* 'empty' vector were used. pBluescript was added to each transfection to equalise total DNA to 2 µg. Luciferase activity was measured after 24 hours. For transgenesis experiments in Medaka, plasmids purified using the Genopure Plasmid Midi Kit (Roche) were injected at the one-cell stage into Medaka oocytes CAB strain, at 15 ng/µl (Conte and Bovolenta, 2007). Embryos were analysed for EGFP expression (by fluorescence and confocal microscopy) in the hypothalamus at stage 19. To determine whether *Sox2* regulates reporter expression, *Nkx2.1 wt-long-EGFP* was co-injected with *Sox2* mRNA or a *Sox2*-specific, already validated morpholino (MO) (Beccari et al., 2012). ISH was as described (Conte and Bovolenta, 2007) using probes against Medaka *Nkx2.1*, *Arx* and *Dmbx* (*Arx* and *Dmbx* representing diencephalic and mesencephalic markers, respectively). Subsequently, three independent stable transgenic lines were selected.

In utero electroporation

E13.5 C57/Bl6 pregnant mice were anaesthetised and DNA introduced by electroporation *in utero* as described (Sanchez-Camacho and Bovolenta, 2008) using a solution containing a 1:1 mixture of *Nkx2.1 wt-long::EGFP* and pCAG-Cherry (2 µg/µl). Embryos were collected and analysed after 48 hours (E15.5) by sectioning the brains in 50-µm-thick frontal sections. GFP expression was enhanced by immunostaining with rabbit anti-GFP (1:1000, Molecular Probes).

RESULTS

Sox2 early deletion severely impairs embryonic brain development

To ablate *Sox2* in the early embryonic brain, we bred mice carrying a *Sox2^{flox}* conditional mutation (Favaro et al., 2009) to mice expressing the Cre-recombinase gene under the control of the *Bfl* regulatory regions, specifically active in the developing telencephalon from embryonic day (E) 9.5 of development (*Bflcre* 'knock-in') (Hébert and McConnell, 2000). In *Sox2^{flox/flox}; Bflcre* embryos, *Sox2* protein was completely ablated by E9.5 in the telencephalon, though not in more posterior neural tube regions, as expected (Fig. 1A). This caused early morphological defects: at E12.5, telencephalic vesicles were reduced and the eyes were abnormal (Fig. 1B,C). Interestingly, although the whole telencephalon was affected, the ventral part was much more severely compromised than the dorsal one (Fig. 1C,F); histological sections (Fig. 1F) showed that the ventral primordia of the medial ganglionic eminence (MGE), involved in the generation of the basal ganglia (Sur and Rubenstein, 2005; Hébert and Fishell, 2008), were severely reduced (Fig. 1F, arrowhead). These initial defects developed into profoundly abnormal development, leading to death just after birth. At E18.5, mutant pups had a smaller head (Fig. 1E) and the telencephalon was smaller than in wild type (Fig. 1D,G: compare with the almost unaffected midbrain); also, the olfactory bulbs and the midline ventral structures were absent (Fig. 1D, black arrowhead pointing to ventral 'hole'). In tissue sections, the ventral midline and the immediately adjacent territories were missing (Fig. 1G, arrowheads).

In agreement with the early MGE abnormalities, GABAergic cortical interneurons, which originate in the MGE and then migrate to more dorsal locations (Sur and Rubenstein, 2005; Hébert and Fishell, 2008; Elias et al., 2008), were strongly decreased in mutants, as indicated by the almost complete loss of somatostatin (SS)-positive and the strong reduction of the neuropeptide Y (NPY)-

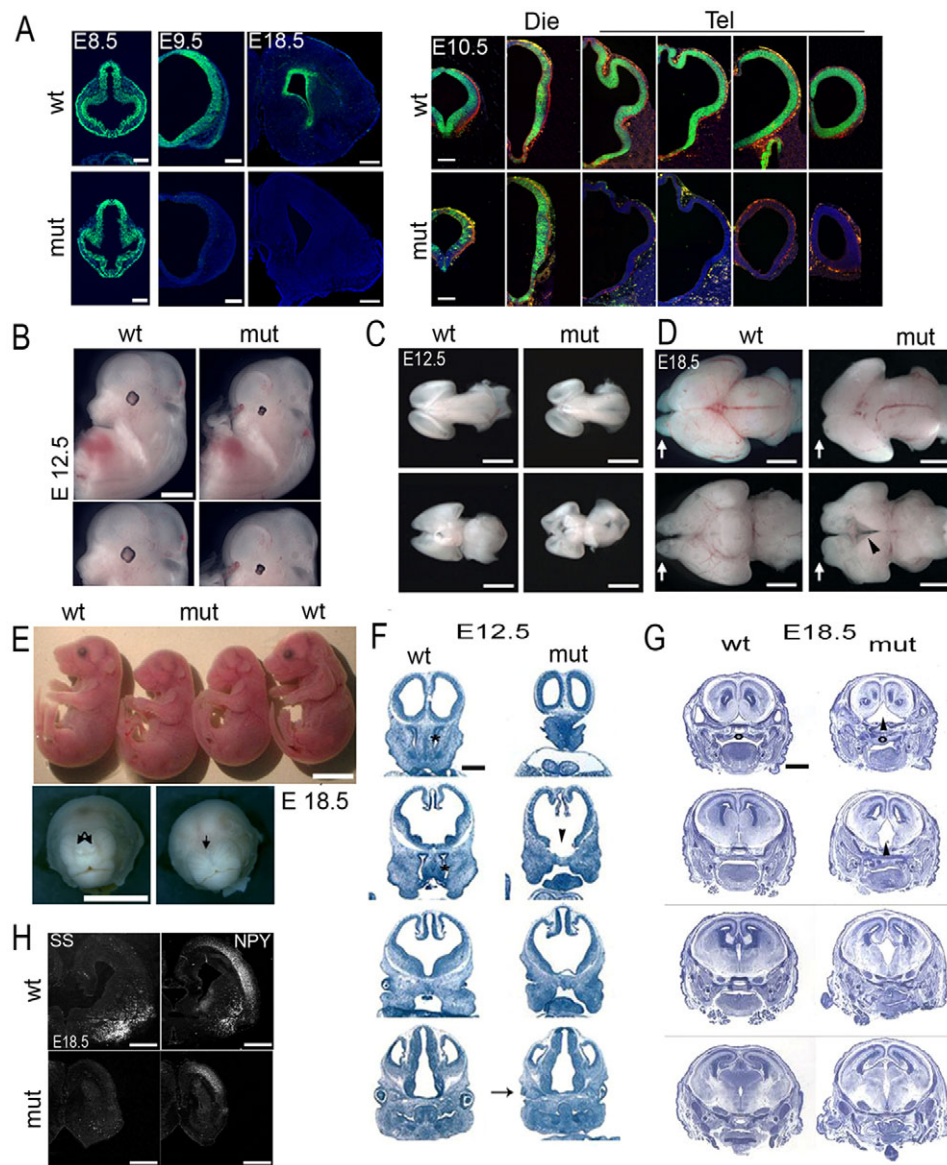


Fig. 1. Early telencephalic ablation of Sox2 with Bf1Cre causes impairment of embryonic brain development. (A) Sox2 immunofluorescence (green) on telencephalic sections of normal (*Sox2^{flx/flx}*) and mutant (*Sox2^{flx/flx};Bf1^{cre}*) mouse embryos. Left: E8.5, E9.5 and E18.5 sections. Sox2 ablation is complete by E9.5. Right: E10.5 sections (posterior left to anterior right). Sox2 ablation is seen in the telencephalon (Tel) but not in the diencephalon (Die). (B–D) Brain abnormalities. (B) E12.5 whole embryos. Note the reduced telencephalon, the comparatively unaffected midbrain and the undeveloped eye. (C) Dissected E12.5 brains, viewed dorsally (top) and ventrally (bottom). Note the smaller telencephalic vesicles and the initial ventral tissue loss. (D) Dissected E18.5 brains viewed dorsally (top) show, in mutant, smaller telencephalon (compare to unaffected midbrain) and absence of olfactory bulbs (arrows). Ventral view (bottom) reveals extensive tissue loss (arrowhead) in mutant. (E) Mutant E18.5 embryos show smaller head and eyes compared with wild type (wt; top), and facial abnormalities including fusion of the anterior nasal plate (bottom; double arrow in wt, single arrow in mutant) and slightly increased eye proximity. (F) E12.5 coronal sections, thionine stained, anterior (top) to posterior. Arrowhead indicates ventral tissue loss (MGE) in mutant; arrow indicates defective mutant eye. Note olfactory epithelium (asterisk in wt) is missing in the mutant. Note the comparatively unaffected diencephalon in the last section. (G) E18.5 coronal sections (thionine stain) reveal major loss of ventral territories, including striatum region (arrowheads). Circle indicates defective maxillary region (palate). (H) ISH for somatostatin (SS) and neuropeptide Y (NPY) shows strong downregulation in the mutant, particularly for SS. Scale bars: 150 μ m.

positive subsets of neurons (Markram et al., 2004; Toledo-Rodriguez et al., 2005; Elias et al., 2008; Hébert and Fishell, 2008) (Fig. 1H). SS-positive interneurons originate from the (dorsal) MGE progenitors and require the Nkx2.1 transcription factor for their development (see below) (Hébert and Fishell, 2008; Butt et al., 2008; Flandin et al., 2011). NPY-positive neurons originate from the progenitor domain of the adjacent preoptic area (Gelman et al., 2009), which may be somewhat less severely affected.

Additional abnormalities included absence of the olfactory epithelium [Fig. 1F, asterisk in wild type (wt)] and face abnormalities: the nasal plate, normally developing a characteristic bilateral symmetry, was consistently centrally fused (Fig. 1E, arrows) and underdeveloped. Furthermore, the eyes were abnormal and extremely reduced in size (Fig. 1B,E,F) (see also Taranova et al., 2006); maxillary structures, e.g. the palate, were also abnormal (Fig. 1G); the cortex (Fig. 1B,D,G) was reduced; and the

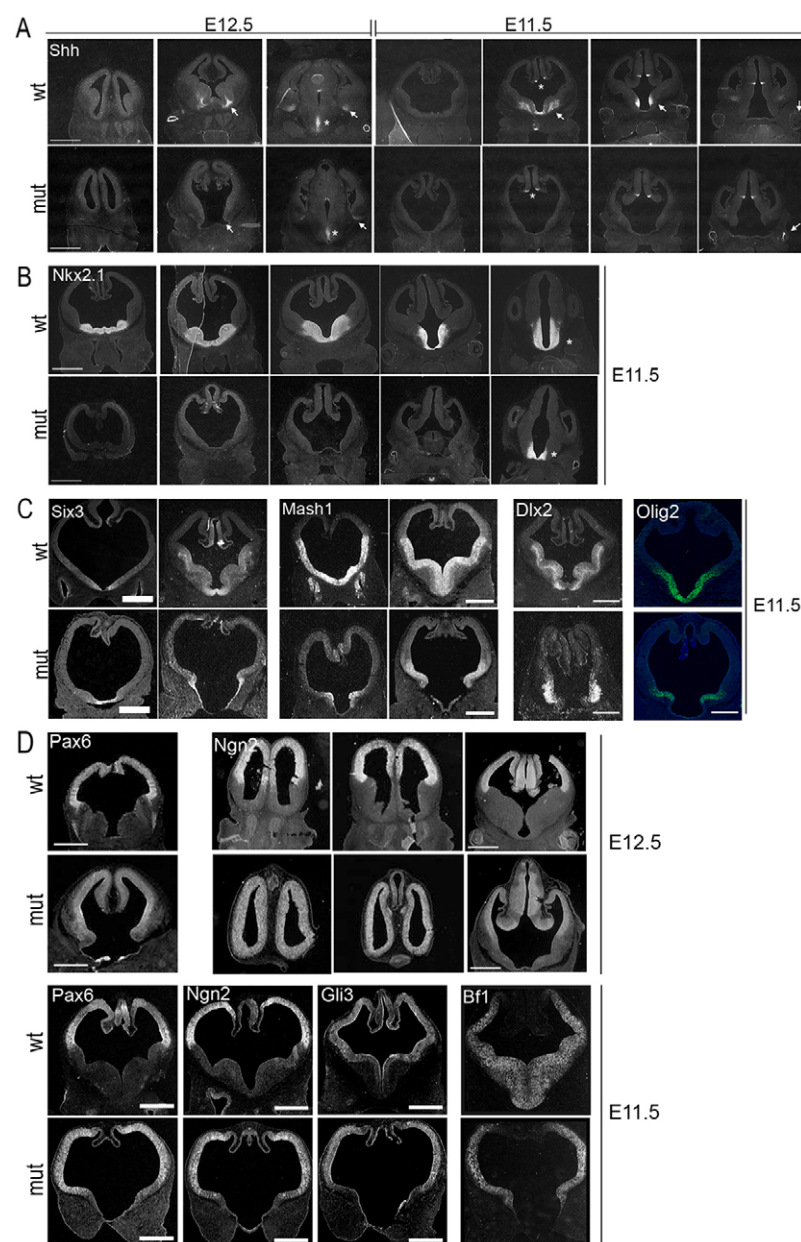


Fig. 2. Expression of ventral determinants is impaired in *Sox2* mutants. (A) ISH with *Shh* probe on E12.5 (left) and E11.5 (right) normal (top) and mutant (bottom) mouse embryos (left anterior to right posterior). Arrows indicate the *Shh* signal in wild type, and its absence (midline region) or important reduction (amygdala region) in mutants. Asterisks indicate the signal in diencephalon, a non-*Sox2*-deleted region, as an internal control, showing similar intensity. Arrows in the bottom far-right panel indicate the impaired mutant eyes. (B) ISH with *Nkx2.1* probe on E11.5 embryos (left anterior to right posterior). The signal is detected in all telencephalic sections in wild type, but not in mutant. Asterisks indicate the signal in non-*Sox2*-deleted diencephalon, as internal control. (C) ISH with probes for ventrally expressed genes at E11.5. Probes are indicated on each panel. Ventral gene expression shows loss or strong downregulation in mutants. Note *Mash1* and *Six3* hybridisation to the olfactory epithelium of wt, but not mutants. (D) Expression of some dorsally, or dorsally/ventrally, expressed genes in E12.5 and E11.5 mutants, compared with wild type. Expression of *Pax6* and *Ngn2* is maintained but clearly shifted ventrally in E12.5 mutants. Expression of *Bf1* at E11.5 is retained in the mutant (though lost ventrally where tissue loss is observed). Scale bars: 150 μ m.

hippocampus (at E18.5) was severely underdeveloped (not shown). None of the defects described above was seen in control mice (*Sox2^{flox/+} Bf1-Cre*; *Sox2^{flox/+}*; *Sox2^{flox/flox}*) (not shown).

Early expression of ventral forebrain determinants is impaired in *Sox2* mutants

We focused on the most severely affected region, the ventral telencephalon, to study genes known to be involved in its specification and development. We first analysed embryos by ISH at E12.5, when the morphological defect becomes overt, and at E11.5, when the defective morphology can first be appreciated. The *Shh* gene is expressed in the developing ventral telencephalon, and is crucial at early stages for the development of this region (Fuccillo et al., 2004; Sousa and Fishell, 2010). Furthermore, we had previously found that *Shh* is a *Sox2* target, acting as its functional effector in postnatal hippocampal development (Favaro et al., 2009). By E12.5, *Shh* mRNA is completely absent in the midline region following the loss of the tissue expressing it, and is strongly

downregulated in the amygdala region (Fig. 2A); in E11.5 mutant embryos, *Shh* is already severely downregulated in the medial ventral telencephalon (Fig. 2A). Indeed, deletion of the *Shh* gene, or that of its receptor *Smo*, from the early ventral telencephalon using the same *Bf1-Cre* transgene (Fuccillo et al., 2004) produces abnormalities very similar to those of our mutants. Importantly, these abnormalities are less severe than those seen in the complete *Shh* knockout, in which *Shh* expression in the prechordal plate mesoderm is also lost (Chiang et al., 1996).

The transcription factor *Nkx2.1*, a direct regulator of *Shh* (Sussel et al., 1999; Jeong et al., 2006), is specifically expressed in the MGE within the developing brain, and is absolutely required for its development (Sussel et al., 1999; Butt et al., 2008; Nöbrega-Pereira et al., 2008). In *Sox2* mutants, *Nkx2.1* expression was already undetectable at E11.5 in the telencephalon (Fig. 2B), but still observed in the non-*Sox2*-deleted diencephalon (Fig. 2B).

Six3, another transcription factor essential for ventral telencephalic development (Lagutin et al., 2003; Geng et al., 2008),

is also a direct activator of *Shh* (Jeong et al., 2008); expression of *Six3* was only slightly reduced at E11.5, in coincidence with the initial tissue loss (Fig. 2C). Expression of the gene encoding *Mash1* (Ascl1 – Mouse Genome Informatics), a transcription factor expressed in the MGE and lateral ganglionic eminence (LGE) and important for GABAergic interneuron development (Guillemot 2007), was essentially lost in regions close to the midline, and reduced more laterally (Fig. 2C). The genes encoding *Dlx2* and *Olig2*, two transcription factors expressed in the MGE and LGE, downstream of *Shh* activity (Fuccillo et al., 2004), and required for ventral telencephalic development (Sur and Rubenstein, 2005; Hébert and Fishell, 2008), were similarly reduced (Fig. 2C). The *Ebf1* transcription factor is expressed within the developing LGE, but not the MGE (Fuccillo et al., 2006; Geng et al., 2008); expression of *Ebf1* was maintained, to some extent, in mutants (supplementary material Fig. S2). These data are consistent with a severe loss of MGE, but some degree of maintenance of LGE primordia.

In contrast to the strong reduction of the ‘ventral’ effectors described above, expression of transcription factor genes marking the dorsal brain and required for its development, such as *Pax6*, *Ngn2* (*Neurog2* – Mouse Genome Informatics) and *Gli3*, was maintained at E11.5–12.5 in mutants, with a clear tendency for dorsal-specific expression to spread ventrally (Fig. 2D), particularly at E12.5.

Expression of the gene encoding *Bf1*, a transcription factor expressed both dorsally and ventrally, but required mainly in ventral regions (Gutin et al., 2006; Hébert and Fishell, 2008), was maintained in lateral and dorsal regions, though it was severely reduced in the area affected by initial tissue loss (Fig. 2D, lower-right panel).

Early downregulation of *Nkx2.1* precedes ventral tissue loss

As morphological abnormalities are already evident at E11.5, we investigated whether any gene expression defects precede their development. At E10.5 and E9.5, *Nkx2.1* expression was clearly detectable in the ventral telencephalon of the wild type, but was strongly downregulated or absent in the mutant (Fig. 3A). Consistent with a relationship between *Sox2* and *Nkx2.1* expression, the latter was clearly present in diencephalon (Fig. 3A), where *Sox2* was normally expressed (Fig. 1A). Similarly, *Shh* expression, which largely overlaps with that of *Nkx2.1*, was absent or weak in a few of the mutant embryos at E10.5 (not shown). *Six3* expression was only slightly decreased in mutants at E10.5 and E9.5 (Fig. 3B,C). By contrast, the gene encoding *Bf1*, which acts in parallel with *Shh* (Hébert and Fishell, 2008), was normally expressed in *Sox2* mutants, compared with controls (Fig. 3C). *Sox1* and *Sox3*, members of the same *Sox* transcription subfamily as *Sox2*, are widely co-expressed with *Sox2* in the telencephalon; they do not show major variations in mutant embryos at these stages (Fig. 3C). *Sox9*, which stimulates NSC growth after E10.5–11.5 (Scott et al., 2010), was normally expressed at these early stages (supplementary material Fig. S1).

We conclude that *Sox2* deletion affects the expression of early, important determinants of brain development, in a region-specific manner: several ventral fate genes are severely affected, whereas activity of dorsal genes is maintained. Notably, one essential effector of ventral telencephalon and MGE development, and activator of *Shh*, *Nkx2.1*, is downregulated at early stages.

Increased apoptotic cell death in early *Sox2*-mutant ventral telencephalon

We investigated whether ventral tissue loss in *Sox2* mutants was due to impaired cell proliferation and/or increased cell death. Cell

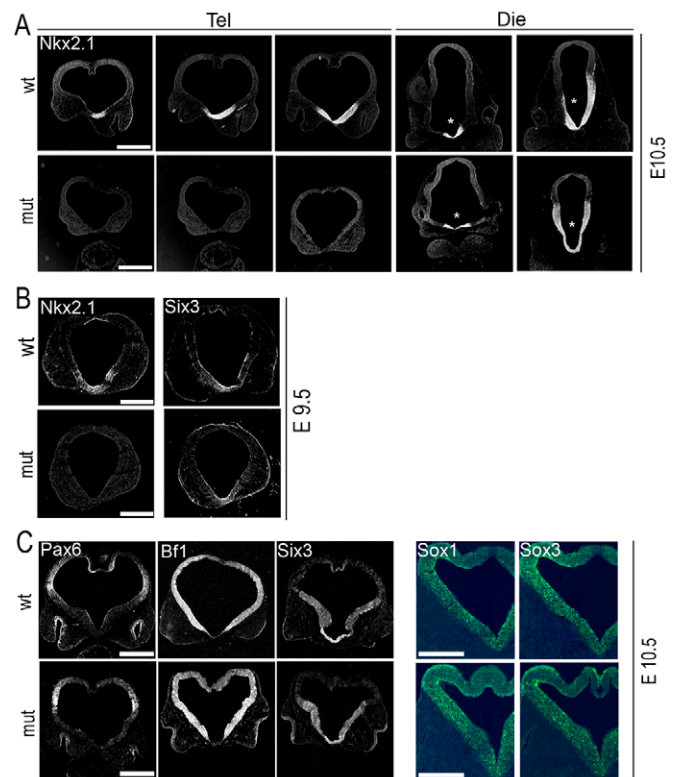


Fig. 3. Gene expression abnormalities are detected by *in situ* hybridisation at early stages of development, preceding morphologic impairment in mutants. (A,B) *Nkx2.1* expression is not established in the telencephalon (Tel) of mouse mutants at E10.5 (A) or E9.5 (B), but is preserved in the adjacent non-*Sox2*-deleted diencephalon (Die). *Six3* expression is only slightly reduced at E9.5. Asterisks indicate the *Nkx2.1* signal in non-*Sox2*-deleted diencephalon. (C) *Pax6*, *Bf1*, *Six3* and (by immunofluorescence) *Sox1* and *Sox3* do not show major changes in mutants at E10.5. Scale bars: 200 µm.

proliferation, assessed by BrdU labelling at E9.5 and E10.5 just prior to the appearance of morphological defects, was not decreased overall in mutant telencephalon or specifically in the ventral region (Fig. 4A). Apoptotic cell death, assayed by TUNEL, was comparable between normal and mutant embryos at E9.5, but a threefold increase in TUNEL-positive cells was observed in the ventral telencephalon of E10.5 mutants (Fig. 4B).

Thus, increased cell death could directly cause ventral tissue loss in the mutants. Apoptotic death is a possible consequence of impaired ventral gene expression (e.g. loss of *Shh*, which has anti-apoptotic activities) (Cayuso et al., 2006), which precedes by at least one day the increase in cell death.

Defective expression of ventral genes and morphological abnormalities of *Sox2* mutants are rescued by a *Shh* agonist

The ventral defects observed in *Bf1*-cre-deleted *Sox2* mutants are very similar to those observed in mutants of the sonic hedgehog pathway [in which the *Shh* receptor smoothened (*Smo*) is conditionally ablated with the same deleter, *Bf1cre*] (Fuccillo et al., 2004), as well as to that of *Nkx2.1* mutants (Sussel et al., 1999). Indeed, *Sox2* mutants show (Figs 2, 3) severely impaired expression of both *Shh* and *Nkx2.1*, a direct activator of *Shh* (Jeong et al., 2006).

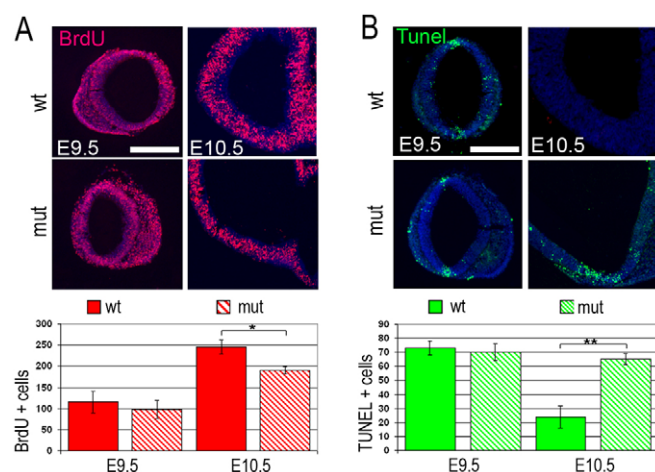


Fig. 4. Cell death is ventrally increased in *Sox2* mutant telencephalon.

(A) Immunofluorescence for BrdU in normal (wt) and mutant (mut) mouse telencephalon; histogram shows quantification of BrdU-positive cells in the ventral half of the telencephalon. (B) TUNEL assay of normal and mutant telencephali. Sections (top) show increased TUNEL signal in mutant, concentrated ventrally. Histogram shows quantification; significantly higher numbers of TUNEL-positive cells are found in mutants compared with wild type at E10.5 ($n=5$ wild-type and mutant embryos analysed, for both assays). Values on the y-axis represent the mean \pm s.d. of the total number of cells counted, on every fifth 20- μ m section throughout the telencephalon (four or five total sections counted for E9.5 or 10.5 brains, respectively). * $P<0.01$; ** $P<0.001$ (Student's *t*-test). Scale bars: 150 μ m.

Hence, we tested whether Shh signalling was involved in the *Sox2* mutant phenotype, by administering mice an agonist (Shh-ag) that activates the Shh co-receptor smoothened (Frank-Kamenetsky et al., 2002). Shh-ag was administered at E8.5 (just prior to *Sox2* ablation) and E10.5. Already at E14.5, expression of ventral determinants *Mash1* and *Dlx2*, which is impaired in the untreated mutants, recovered to a significant, albeit not complete, extent (Fig. 5); morphologically, the ventral brain also recovered a somewhat more normal shape, with ventral bulges reminiscent of wild-type ganglionic eminences (Fig. 5). By contrast, no major effect was observed on brain morphology or gene expression of treated wild-type littermates (Fig. 5).

We conclude that failure to activate Shh signalling is an important cause of the defects observed in *Sox2*-mutant embryonic telencephalon.

***Sox2* activates *Nkx2.1* cell-autonomously**

Nkx2.1 is a direct activator of the *Shh* gene and is required for its expression *in vivo* (Sussel et al., 1999; Jeong et al., 2006; Sousa and Fishell, 2010); however, *Nkx2.1* expression is also stimulated in response to Shh signalling (Fuccillo et al., 2004; Xu et al., 2005; Gulacsi and Anderson, 2006; Sousa and Fishell, 2010). *Nkx2.1* expression failed to be established early in *Sox2* mutants, and remained absent at later stages (Figs 2, 3); we thus investigated whether loss of *Nkx2.1* expression depends on *Sox2* cell-autonomously or is secondary to the loss of Shh expression. To this end, we used a *Sox2*^{CreERT2} transgene, encoding the tamoxifen-activatable Cre guided by the *Sox2* telencephalic enhancer/promoter (Favaro et al., 2009). Tamoxifen treatment at E8.5 and E10.5 caused a 'salt-and-pepper' deletion of *Sox2*, as seen by immunofluorescence at E14.5 (Fig. 6); some Shh expression,

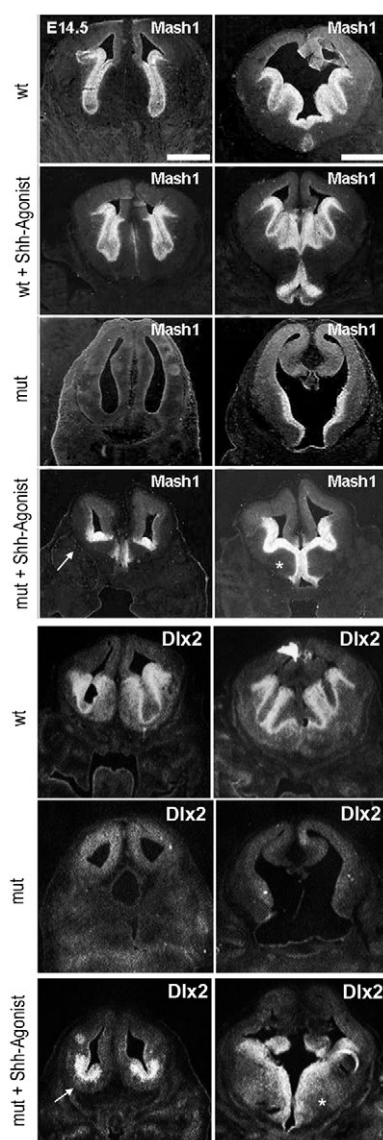


Fig. 5. A pharmacological Shh agonist significantly rescues ventral gene expression and morphology in *Sox2* mutants.

ISH for ventral markers *Mash1* (top) and *Dlx2* (bottom) on normal (wt) and *Sox2*-deleted mouse embryos (mut), treated with Shh agonist or untreated. Telencephalic sections at two levels, anterior (left) and posterior (right), are shown. Expression of *Dlx2* and *Mash1*, strongly impaired (particularly anteriorly) in mutants by E14.5, is significantly rescued in treated mutants, together with an improved ventral morphology. No major effect is seen in the same region on normal embryos from the same litter. A representative experiment is shown out of $n=4$ mutant embryos analysed. Scale bars: 200 μ m.

presumably arising from non-deleted cells, was maintained (Fig. 6), and no major abnormality was noticed in these mosaic-deleted embryos. We analysed *Nkx2.1* and *Sox2* expression by immunofluorescence in the ventral telencephalic ventricular zone. In control embryos, most cells co-expressed *Sox2* and *Nkx2.1* (Fig. 6). In tamoxifen-treated embryos, *Sox2*-expressing cells were strongly reduced; *Nkx2.1* expression was retained in cells in which *Sox2* was still expressed, but was rarely, if ever, seen in cells that did not express *Sox2* (Fig. 6). We conclude that expression of *Nkx2.1* requires *Sox2* cell-autonomously.

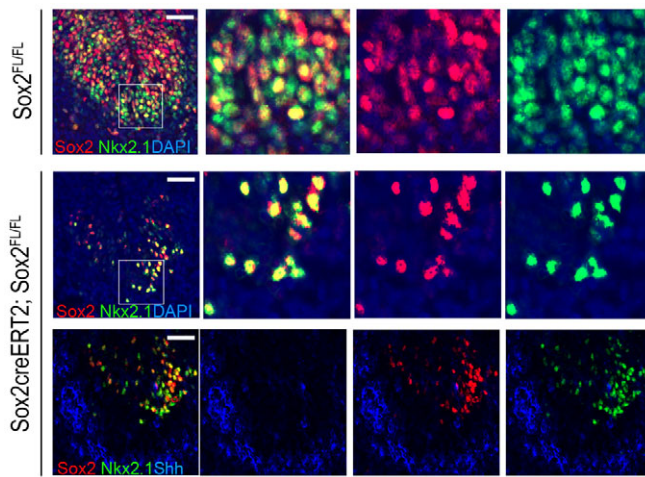


Fig. 6. Mosaic Sox2 ablation via a *Sox2CreERT2* transgene leads to cell-autonomous loss of *Nkx2.1*. Immunofluorescence for *Nkx2.1* (green) and Sox2 (red) in normal mouse embryos (*Sox2^{flox/flox}*; top row) at E14.5 in the ventral telencephalon. Left-hand panel: general view at low magnification; right-hand panels (top and intermediate rows) show a magnification of the boxed area, with merged and separated colour channels. Sox2 and *Nkx2.1* are co-expressed in most cells in the wild type. In *Sox2CreERT2*; *Sox2^{flox/flox}* embryos treated with tamoxifen at E8.5 and E10.5, only a fraction of ventral telencephalic cells retains Sox2 expression (second row, compare stained cells with total DAPI-labelled nuclei); *Nkx2.1* is detected in those cells that show Sox2 expression. *Shh* is detectable by immunofluorescence (blue in lower row) in this region. One representative experiment is shown out of $n=3$ embryos analysed. Scale bars: 500 μ m.

Regulation of *Nkx2.1* by Sox2

The early loss of *Nkx2.1* following Sox2 telencephalic ablation (Figs 2, 3) raised the possibility that *Nkx2.1* expression is directly controlled by Sox2, within a specific subregion of the Sox2 pan-neuronal expression domain.

In a survey for evolutionarily conserved regions in the *Nkx2.1* genomic locus, we detected a small conservation peak just upstream to the second *Nkx2.1* exon (Fig. 7A,B). Evolutionary conservation within this region was present across vertebrate evolution (Fig. 7A). This region included a single and a twin potential Sox2-binding sites; both sites are conserved in mammals, and at least one site is conserved in vertebrates, including teleostean fishes (Fig. 7A). The *Nkx2.1* gene has two promoters, one upstream to the first exon ('distal' promoter), the other in the intron between exon 1 and 2 ('proximal' promoter), both of which are functional *in vitro* and *in vivo* (including E10.5 and E14.5 telencephalon; supplementary material Fig. S3), though the latter might be the stronger (Pan et al., 2004; Hamdan et al., 1998). The Sox2-binding sites (Fig. 7B) lie in the region between the 'distal' and 'proximal' transcriptional start sites. ChIP from E14.5 embryos gave a moderate (2.5-fold) enrichment for this region (not shown). To develop a functional reporter assay for promoter sequences, we cloned a fragment including the conserved Sox2 sequences from the *Nkx2.1* region upstream to a green fluorescent protein (*GFP*) gene (Fig. 7B), and tested it in Medaka embryos. These sequences drove *GFP* activity in forebrain regions superimposable with those showing endogenous *Nkx2.1* expression (Fig. 8A,B). In line with these observations, ChIP from stage 16–18 Medaka embryos with anti-Sox2 antibody revealed a 30-fold enrichment (relative to ChIP with a non-related IgG) of the *Nkx2.1* intronic conserved element, which

was not observed in negative control regions (a different region of the *Nkx2.1* gene devoid of Sox2 consensus sites and the 18S RNA-encoding gene) (Fig. 8C), indicating that Sox2 binds to the *Nkx2.1* promoter/enhancer *in vivo*.

Co-injection of Sox2 mRNA enhanced expression of the *Nkx2.1-GFP* transgene (Fig. 8F,J, compare with 8D,H), as well as of the endogenous *Nkx2.1* gene, which is both increased and expanded anteriorly, as detected by ISH (Fig. 8N, compare with 8L). Conversely, co-injection of anti-Sox2 morpholino (Sox2 MO) (Beccari et al., 2012) (Fig. 8H,I) antagonised the activity of the co-injected *Nkx2.1-GFP* transgene (Fig. 8E,I, compare with 8D,H), as well as endogenous *Nkx2.1* expression, the domain of which was also reduced (Fig. 8M, compare with 8L).

To evaluate the importance of a direct action of Sox2 on transgene regulation, we mutated the conserved Sox2 sites within the *Nkx2.1-GFP* transgene. GFP expression required the integrity of the Sox2-consensus sites, as their mutation caused a substantial loss of transgene activity (Fig. 8G,K, compare with 8D,H). This result is consistent with experiments showing that mutation of the same Sox2 sites in a luciferase-reporter gene driven by the 'proximal' promoter abolishes the response to co-transfected Sox2 in P19 teratocarcinoma cells (Fig. 7C).

These experiments show that Sox2 is an important regulator of *Nkx2.1* expression in Medaka fish. In Medaka fish, the telencephalon is substantially reduced in size and lacks detectable endogenous *Nkx2.1* expression (Fig. 8A,L). This raises the question of whether the *Nkx2.1* regulatory elements studied here are sufficient to drive expression in the ventral telencephalon of the mouse. We thus tested the GFP construct described above in E13.5 mouse telencephalon by transient electroporation. Supplementary material Fig. S4 shows that two days after electroporation the transgene is expressed in the ventral telencephalon. At E13.5–15.5, mutation of the Sox2 sites had little effect on telencephalic expression, indicating that, at this developmental stage, other transcription factor-binding sites play a role in the regulation of this construct in the telencephalon (see Discussion).

DISCUSSION

The Sox2 transcription factor is crucial for the maintenance of several types of stem cells, including pluripotent, neural and osteogenic stem cells (Masui et al., 2007; Favaro et al., 2009; Basu Roy et al., 2010). Despite the importance of Sox2 in NSCs *in vitro*, major abnormalities in brain development were not detected by conditional ablation of Sox2 at midgestation (E12.5) in mouse, with the exception of defects in postnatal development of the hippocampus dentate gyrus and of the retina (Taranova et al., 2006; Miyagi et al., 2008; Favaro et al., 2009). Here, we examined the hypothesis that Sox2 is required in the developing telencephalon at early developmental stages. By conditionally deleting Sox2 by E9.5 in all the developing telencephalon, we discovered that Sox2 deletion strongly affects embryonic development of the ventral telencephalon. Patterning of the ventral telencephalon is crucially dependent on the induction of the diffusible factor Shh, which is mediated by the transcription factor *Nkx2.1* (Sousa and Fishell, 2010). The crucial role of Shh is highlighted by the severe abnormalities in patients affected with holoprosencephaly, a developmental defect of the brain ventral midline, caused by *SHH* mutations (Dubourg et al., 2004; Roessler and Muenke, 2010). Here, we show that Sox2 is required for the early expression of *Nkx2.1*, thus controlling downstream ventral patterning genes such as *Shh*.

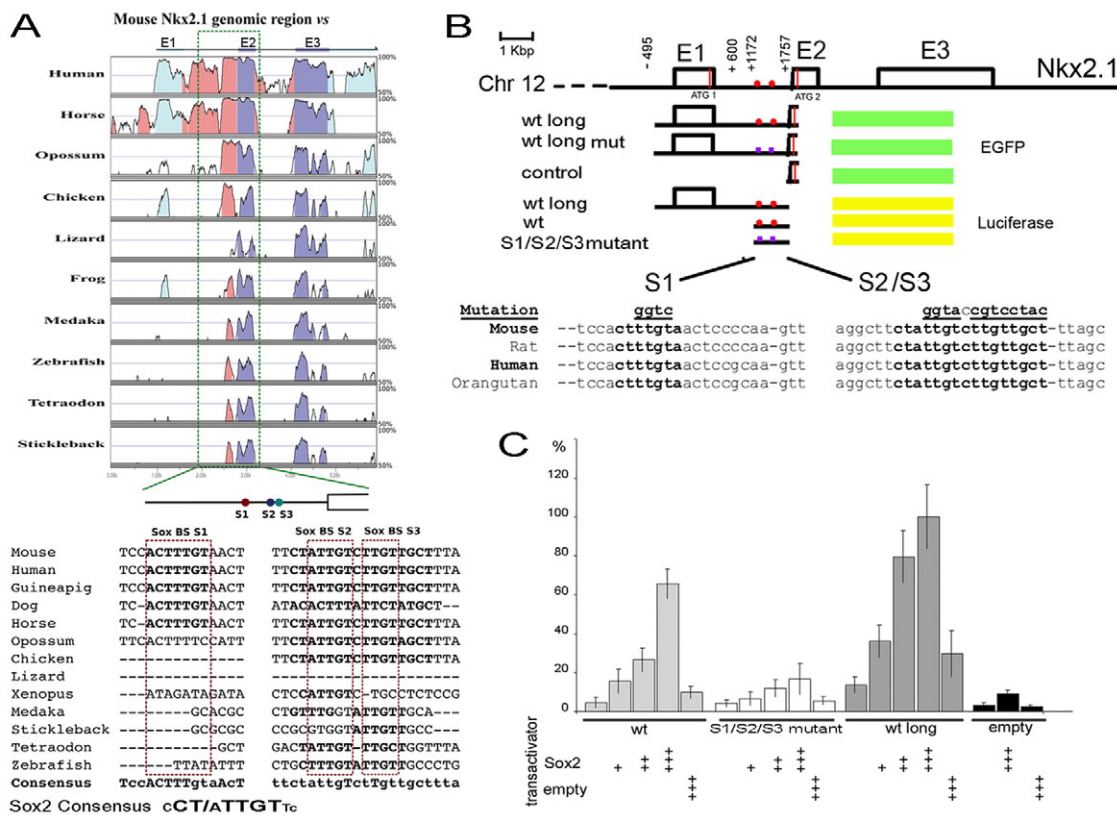


Fig. 7. *Nkx2.1* regulation by Sox2. (A) The *Nkx2.1* intronic promoter/enhancer is evolutionary conserved in vertebrates. The genomic *Nkx2.1* sequences from the different vertebrate species were retrieved from the UCSC genome browser and aligned using the Shuffle-LAGAN of Vista. Pink, pale-blue and violet peaks represent conserved non-coding elements (75% conservation over 100 bp), mRNA untranslated sequence and coding sequence, respectively. Putative Sox2-binding sites, indicated as S1, S2 and S3, localise to a conserved element in the first intron. The S1 binding site is conserved among mammals but not in other vertebrates. S2 and S3 binding sites were conserved among most vertebrates. The indicated Consensus within the alignment was derived with Simple Consensus Maker (<http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/CONSENSUS/SimpCon.html>). The general Sox2 consensus is from Engelen et al. (Engelen et al., 2011). (B) Schematic of the *Nkx2.1* gene (Sox2 sites indicated by red dots) with constructs used for transgenic (EGFP) and transfection experiments (luciferase); sequence shows the Sox sites and the mutations introduced. EGFP constructs: *wt-long*: a region from nucleotide -495 (5' to exon 1) to nucleotide +1942 in the second exon was cloned in frame with the EGFP reporter (green box); this fragment comprises the conserved elements in the first intron. *wt-long-mut*: carries mutations in the Sox2 sites, shown below (underlined). *control*: promoter-less EGFP construct. Luciferase constructs: *wt-long*: same region as in the EGFP construct, here linked to a luciferase reporter. *wt*: a shorter region encompassing the two Sox2 sites, from +1172 to +1757. *S1/S2/S3 mutant*: same as *wt*, with the same Sox2 mutations as in the *wt-long-mut*-EGFP reporter. (C) Co-transfection in P19 cells of *Nkx2.1* promoter with luciferase vectors (1 μ g) and their mutant versions (shown in B), with increasing amounts (+, 0.125 μ g; ++, 0.25 μ g; +++, 0.5 μ g) of Sox2-expressing vector (Sox2), or with the corresponding 'empty' vector. Results are the mean of at least three independent transfections, in triplicate.

Early Sox2 loss affects *Nkx2.1* and *Shh* expression

In *Bfl1-cre Sox2*-deleted embryos, extensive ventral tissue loss occurs starting at ~E11.5, developing into major abnormalities of the ganglionic eminences (particularly the MGE) and of MGE-derived GABAergic neurons at later stages (Fig. 1); the expression of the dorsal markers *Pax6* and *Ngn2* (Fig. 2) also tends to spread ventrally, pointing to abnormalities of the ventral versus dorsal specification of the telencephalon. These defects strongly resemble those observed in *Nkx2.1* germ-line deletion and in the conditional ablation (via *Bfl1-cre*) of the *Shh* receptor *smoothed* (Sussel et al., 1999; Fuccillo et al., 2004; Sousa and Fishell, 2010). We confirmed the connection to *Shh* by showing that *Shh* expression is strongly diminished in the ventral region of the mutant telencephalon concomitantly and prior to the onset of tissue loss (Figs 2, 3). Moreover, treatment of the embryos with a *Shh* agonist substantially rescued ventral development in the mutant brain (Fig. 5), though prenatal lethality still occurred. This rescue is reminiscent of that of the hippocampal dentate gyrus stem cells and postnatal growth by

the same drug, in *nestin-cre Sox2*-deleted mice (Favaro et al., 2009). Local cell death in the ventral telencephalon is detected just prior to the onset of tissue loss (Fig. 4); this might also relate to loss of *Shh* signalling, which activates the anti-apoptotic gene *Bcl2* (Cayuso et al., 2006). These data, together with those of Favaro et al. (Favaro et al., 2009), highlight an unexpected role of Sox2 in mediating the development of specific brain regions at defined stages via *Shh*-dependent regulation.

How does Sox2 regulate *Shh* expression in the ventral telencephalon? Sox2 might regulate genes involved in local specification of ventral regions. A prime candidate target is *Nkx2.1*, essential for ventral brain development and correct dorsoventral patterning (Sussel et al., 1999; Sousa and Fishell, 2010). *Nkx2.1* is thought to mediate the early 'homogenetic' induction of *Shh* in the ventral telencephalon, in response to the gradient of mesendoderm-derived *Shh* (Sousa and Fishell, 2010). Indeed, *Nkx2.1* mutant mice fail to express *Shh* in the ventral region (Sussel et al., 1999), and their phenotype resembles both that of *Shh* or *smoothed* mutants

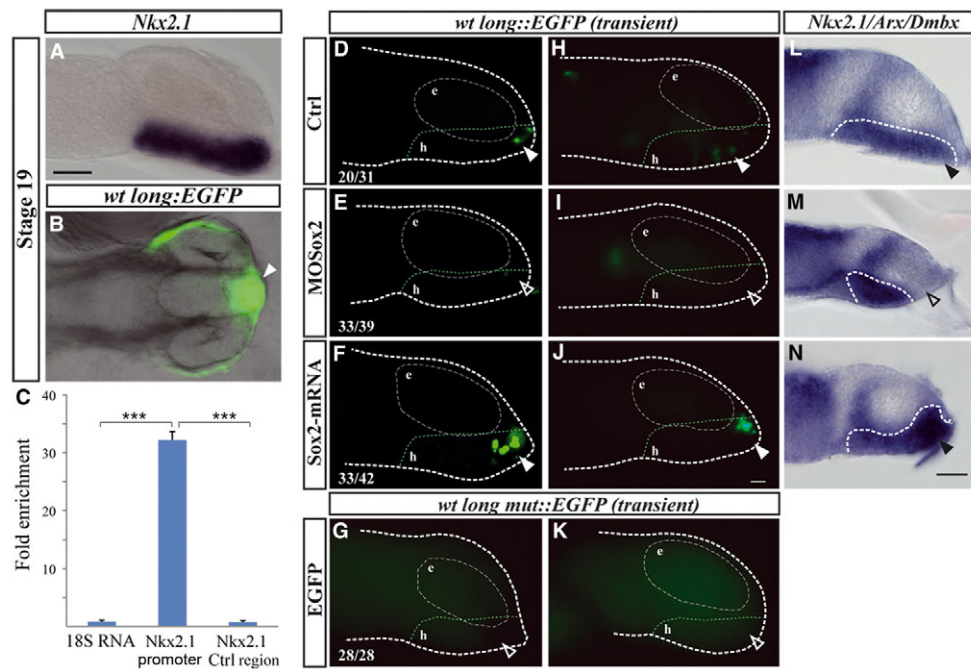


Fig. 8. *Nkx2.1* transgene and endogenous gene regulation by Sox2 in Medaka. (A) Lateral view of stage 19 Medaka embryo hybridised with an *Nkx2.1*-specific probe. (B) Dorsal view of a stable transgenic Medaka fish embryo carrying the EGFP reporter driven by the mouse *Nkx2.1* promoter/enhancer (*wt long*). Note the expression of the EGFP reporter corresponding to anterior hypothalamus (white arrowhead). (C) ChIP performed with anti-Sox2 on chromatin from stage 19 Medaka embryos. The histograms show the mean value+s.e.m. of a representative experiment performed in triplicate. Fold enrichment for the tested regions (*Nkx2.1* promoter, and a control region (*Nkx2.1*-Ctrl region) located 2783 bp downstream of the predicted *Nkx2.1* start codon) was normalised to control IgG and compared with 18s RNA. *** $P < 0.0001$. (D-N) Medaka fish embryos were co-injected with control (D,H,L,G,K), Sox2 MO (E,I,M) or Sox2 mRNA (F,J,N). Lateral views of transient transgenic Medaka fish embryos carrying the EGFP reporter driven by the *wt long* (D-F,H-J) or mutated (*wt long mut*) (G,K) mouse promoter/enhancer (confocal microscopy, G-N) and of embryos hybridised *in toto* with probe against diencephalic (*Arx*), mesencephalic (*Dmbx1*) and hypothalamic (*Nkx2.1*) markers (L-N). As expected for transient transgenic embryos, injections of the *wt long::EGFP* construct activates reporter expression with a variable (compare D with H, white arrowheads) mosaic pattern in discrete cells always in the anterior domain of the hypothalamus. Reporter expression is no longer observed when embryos are injected with the mutated version (unfilled arrowheads in G,K) or co-injected with Sox2 MO (empty arrowheads in E,I), whereas expression is increased in intensity upon Sox2 mRNA injection (white arrowheads in F,J). Note also the parallel reduction (unfilled arrowhead in M) or expansion (black arrowhead in N) of the anterior hypothalamic mRNA distribution of *Nkx2.1* (black arrowhead in L), whereas the distribution of diencephalic and mesencephalic markers did not change. The shape of the embryos and of the eye (e) are outlined by dashed white lines. The *Nkx2.1*-positive hypothalamic domain (h) is outlined by green dotted lines. Frequency of the observed phenotype for each one of the experimental conditions is indicated in the bottom-left corner of panels (D-G). Two prototypic embryos are shown for each experimental condition. Scale bars: 50 μ m in A-K; 40 μ m in L-N.

(Fuccillo et al., 2004), and that of the present *Sox2* mutant. Furthermore, mutations destroying a consensus *Nkx2.1*-binding site in a distant *Shh* enhancer, active in telencephalon, impair the transcription of reporter constructs in transgenic mice (Jeong et al., 2006). Finally, *Nkx2.1* is required for expression of transcription factors *Lhx6* and *Lhx8* (also known as *Lhx7*) (Sussel et al., 1999), which coordinately activate *Shh* in neurons in the developing MGE (Flandin et al., 2011).

The early severe impairment of *Nkx2.1* expression in *Sox2* mutants already by E10.5 (Fig. 3), and the absence of *Shh* at least from E10.5/11.5 onwards (Fig. 2), are consistent with the hypothesis that a large part of the phenotypic effects of *Sox2* ablation is initially mediated by *Nkx2.1* deficiency.

Do other transcription factors mediate the effects of *Sox2* deficiency?

Presently, we can neither rule out nor implicate other genes besides *Nkx2.1* (and *Shh*) in the early effects of *Sox2* ablation. *SIX3* mutations are found in some human patients affected with holoprosencephaly (Jeong et al., 2008), and *Six3* haploinsufficiency caused by the 'knock-in' of a human mutant *SIX3* gene impairs *Shh*

expression and MGE development in mouse, recapitulating features of the human phenotype (Geng et al., 2008). Moreover, a mutation in a *SIX3*-binding site, within a *SHH* long-range acting enhancer, has been detected in a human holoprosencephalic patient (Jeong et al., 2008). In our mutants, *Six3* expression was only slightly diminished in the ventral region at early stages, when *Nkx2.1* expression was already substantially affected (Figs 2, 3), making it unlikely that the effects of *Sox2* ablation are mediated by *Six3* deficiency. Interestingly, in the Medaka telencephalon, *Sox2* activates *Six3*, but the two genes seem to have antagonistic function in the hypothalamus (Beccari et al., 2012). The expression of *Bfl1*, another candidate gene (Gutin et al., 2006; Hébert and Fishell, 2008), was also not significantly affected at these early stages, despite the *Bfl1* hemizygosity due to cre 'knock-in' (Fig. 3).

After *Nkx2.1* (and thus *Shh*) expression is initially activated by mesendoderm-derived *Shh*, its activity is normally maintained, at later stages, by *Shh* itself (Xu et al., 2005; Xu et al., 2010; Sousa and Fishell, 2010). Following mosaic *Sox2* deletion at E8.5 (Fig. 6), *Nkx2.1* is poorly expressed later on in *Sox2*-deleted cells, even in the presence of *Shh*. These data do not contradict the notion that *Shh* maintains later expression of *Nkx2.1* (Xu et al., 2005; Xu et

al., 2010), but simply highlight an early requirement for Sox2 in establishing this process.

The ventral telencephalic defects due to *Sox2* early ablation point to a marked regional specificity of Sox2 requirement in development (Fig. 1). As an example, Sox2 is required for *Nkx2.1* (and *Shh*) (see also Favaro et al., 2009) expression only within a specific subregion of the Sox2 pan-neural expression domain (Figs 2, 3). This might depend on local Sox2 concentrations, and/or on the presence of additional co-regulators. The transcription factors Sox1 and Sox3 are closely related to Sox2 (Wegner and Stolt, 2005), and recognise similar DNA sequences *in vitro* (Kondoh and Kamachi, 2010; Wegner, 2010). Thus, in regions in which Sox2 ablation causes few or no defects, Sox1 and/or Sox3 might compensate for Sox2 deficiency. Indeed, embryos doubly mutant for *Sox2* and *Sox3* (*Sox2*^{+/-}; *Sox3*^{-/-}) develop diencephalic defects, mirroring those observed following early diencephalic deletion of the *Shh* gene (Zhao et al., 2012); by contrast, no such defects were observed in single mutants. Thus, Sox3 does compensate for some Sox2 functions in the diencephalon. By contrast, in the ventral telencephalon (present paper), Sox2 has some region-specific functions that cannot be complemented by Sox3 and Sox1, in spite of their normal expression levels (as also observed in Medaka) (Beccari et al., 2012). Most sequence diversity between Sox1, Sox2 and Sox3 occurs outside the DNA-binding domain; unique partnerships between Sox2 and co-factors (Kondoh and Kamachi, 2010; Bernard and Harley, 2010; Wegner, 2010) might mediate its specific functions in ventral (and hippocampal) (Favaro et al., 2009) brain development.

Among Sox2-specific interactors/DNA-binding proteins, CHD7 is known to activate a set of common targets relevant for anophthalmia (caused by *SOX2* mutations in humans and mice) and CHARGE syndrome (caused by *CHD7* mutations) (Engelen et al., 2011). The specific expression of different Sox2 interacting/cooperating factors in various tissues might impart regional specificity to the defects caused by the absence of Sox2; indeed, an important (antagonistic) relationship of Sox2 with Pax6 was reported in a study of the development of neural competence in the optic cup (Matsushima et al., 2011).

How does Sox2 regulate *Nkx2.1*?

In Medaka, modulation of Sox2 levels correlates with changes in endogenous *Nkx2.1* expression intensity and spatial distribution (Fig. 8L-N). Moreover, the *Nkx2.1-GFP* construct faithfully recapitulates endogenous *Nkx2.1* expression, and requires intact Sox2-binding sites for activity (Fig. 8B,D-K), consistent with transfection results in P19 cells (Fig. 7C). These data identify *Nkx2.1* as a Sox2 target in Medaka. In Medaka, unlike in mouse, *Nkx2.1* is not active in the telencephalon, and we thus cannot directly extrapolate from the Medaka results to infer direct regulation of *Nkx2.1* by Sox2 in the telencephalon. We tested the same *Nkx2.1* construct in mouse by electroporation in the telencephalon at E13.5-15.5, showing that it is active in the telencephalon, preferentially in the MGE and other ventral regions (supplementary material Fig. S4); however, the mutation of the Sox2 sites did not substantially affect the activity of the construct (not shown). These results formally rule out the possibility that, at the E13.5-15.5 stage, the Sox2-binding sites, per se, are required for activity of the *Nkx2.1* promoters in the telencephalon. As a consequence, it remains unclear whether, in *Sox2* mutant mouse, the observed loss of *Nkx2.1* expression depends on the loss of a direct activity of Sox2 on the *Nkx2.1* promoter (so far unproven), on additional effects on other regulatory elements, or on indirect effects mediated by other Sox2-dependent factors.

How do we reconcile the data obtained by electroporation in mouse telencephalon with the low activity of the Sox2-mutated reporter in Medaka (and in *in vitro* transfected P19 cells)? We speculate that the requirement for Sox2 binding to the *Nkx2.1* promoter (if any) might be limited to the early stages of development. We know that late *Sox2* ablation (E12.5) has little effect on ventral telencephalic development and gene expression (Favaro et al., 2009; unpublished data), whereas early ablation (E9.5) causes important defects. We therefore hypothesise that Sox2-binding sites in the *Nkx2.1* promoter might be required for *Nkx2.1* regulation in mouse telencephalon at early (~E9.5), but not late, stages of development. Once established, *Nkx2.1* expression might be maintained, at E14.5, by transcription factors other than Sox2, and additional regulatory regions might be involved in controlling *Nkx2.1* expression. Unfortunately, the present constructs show very low activity following electroporation at E9.5, and similar transgenic constructs were not expressed in embryonic ventral telencephalon (Pan et al., 2004), making it difficult to test this hypothesis. Several regions adjacent to *Nkx2.1* bind Sox2 in ChIP experiments, and distal intergenic regions exhibit long-range interactions with the *Nkx2.1* gene (not shown), and might potentiate the promoter. These sequences will be investigated in the future in order to determine to their regulatory potential.

Conclusions

Sox2, despite its ubiquitous expression in neural stem/progenitor cells at all levels of the developing central nervous system, is absolutely required, in a stage- and region-specific way, in a limited set of locations, here exemplified by the early ventral telencephalon and by the hippocampus (Favaro et al., 2009). In the ventral telencephalon, *Nkx2.1* is likely to be the main (although not necessarily the exclusive) mediator of Sox2 effects; other factors might mediate Sox2 activities in different regions. Expression defects of *Shh* (a target of *Nkx2.1* in the ventral telencephalon), are common to both territories affected by Sox2 loss (ventral telencephalon and hippocampus); it will be interesting to examine other embryonic brain sites expressing *Shh* for defects caused by Sox2 ablation at different developmental stages.

Acknowledgements

We thank Carol Yan for help with *Sox2CreERT2* transgenic experiments, Sara Lazzarin for *in situ* hybridisation; Barbara Costa for advice on pharmacological treatments; and Laura Croci and Giacomo Consalez for the *Ebf1a* probe. S.N. dedicates this work to the dear memory of Cecilia Tiveron and Larisa Pevny, good and generous scientists and friends, who researched development with insight and with love.

Funding

S.K.N. is supported by Cariplo Foundation [grant 20100673]; ASTIL Regione Lombardia [SAL-19, N Prot FL 16874]; Telethon [GGP12152]; and Associazione Italiana Ricerca sul Cancro [AIRC IG-5801]. P.B. is supported by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad [BFU2010-16031]; and the Comunidad Autónoma de Madrid [BDM-2315].

Competing interests statement

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://dev.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/dev.073411/-DC1>

References

- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N. and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* **17**, 126-140.
- Basu-Roy, U., Ambrosetti, D., Favaro, R., Nicolis, S. K., Mansukhani, A. and Basilico, C. (2010). The transcription factor Sox2 is required for osteoblast self-renewal. *Cell Death Differ.* **17**, 1345-1353.

- Beccari, L., Conte, I., Cisneros, E. and Bovolenta, P. (2012). Sox2-mediated differential activation of Six3.2 contributes to forebrain patterning. *Development* **139**, 151–164.
- Bernard, P. and Harley, V. R. (2010). Acquisition of SOX transcription factor specificity through protein-protein interaction, modulation of Wnt signalling and post-translational modification. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 400–410.
- Butt, S. J., Sousa, V. H., Fuccillo, M. V., Hjerling-Leffler, J., Miyoshi, G., Kimura, S. and Fishell, G. (2008). The requirement of Nkx2-1 in the temporal specification of cortical interneuron subtypes. *Neuron* **59**, 722–732.
- Bylund, M., Andersson, E., Novitsch, B. G. and Muhr, J. (2003). Vertebrate neurogenesis is counteracted by Sox1-3 activity. *Nat. Neurosci.* **6**, 1162–1168.
- Cavallaro, M., Mariani, J., Lancini, C., Latorre, E., Caccia, R., Gullo, F., Valotta, M., DeBiasi, S., Spinardi, L., Ronchi, A. et al. (2008). Impaired generation of mature neurons by neural stem cells from hypomorphic Sox2 mutants. *Development* **135**, 541–557.
- Cayuso, J., Ulloa, F., Cox, B., Briscoe, J. and Martí, E. (2006). The Sonic hedgehog pathway independently controls the patterning, proliferation and survival of neuroepithelial cells by regulating Gli activity. *Development* **133**, 517–528.
- Chiang, C., Litingtung, Y., Lee, E., Young, K. E., Corden, J. L., Westphal, H. and Beachy, P. A. (1996). Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* **383**, 407–413.
- Conte, I. and Bovolenta, P. (2007). Comprehensive characterization of the cis-regulatory code responsible for the spatio-temporal expression of *olSix3.2* in the developing medaka forebrain. *Genome Biol.* **8**, R137.
- Dubourg, C., Lazaro, L., Pasquier, L., Bendavid, C., Blayau, M., Le Duff, F., Durou, M. R., Odent, S. and David, V. (2004). Molecular screening of SHH, ZIC2, SIX3, and TGF genes in patients with features of holoprosencephaly spectrum: Mutation review and genotype-phenotype correlations. *Hum. Mutat.* **24**, 43–51.
- Elias, L. A., Potter, G. B. and Kriegstein, A. R. (2008). A time and a place for nkx2-1 in interneuron specification and migration. *Neuron* **59**, 679–682.
- Ellis, P., Fagan, B. M., Magness, S. T., Hutton, S., Taranova, O., Hayashi, S., McMahon, A., Rao, M. and Pevny, L. (2004). SOX2, a persistent marker for multipotential neural stem cells derived from embryonic stem cells, the embryo or the adult. *Dev. Neurosci.* **26**, 148–165.
- Engelen, E., Akinci, U., Bryne, J. C., Hou, J., Gontan, C., Moen, M., Szumska, D., Kockx, C., van Ijcken, W., Dekkers, D. H. et al. (2011). Sox2 cooperates with Chd7 to regulate genes that are mutated in human syndromes. *Nat. Genet.* **43**, 607–611.
- Fantes, J., Ragge, N. K., Lynch, S. A., McGill, N. I., Collin, J. R., Howard-Peebles, P. N., Hayward, C., Vivian, A. J., Williamson, K., van Heyningen, V. et al. (2003). Mutations in SOX2 cause anophthalmia. *Nat. Genet.* **33**, 461–463.
- Favaro, R., Valotta, M., Ferri, A. L., Latorre, E., Mariani, J., Giachino, C., Lancini, C., Tosetti, V., Ottolenghi, S., Taylor, V. et al. (2009). Hippocampal development and neural stem cell maintenance require Sox2-dependent regulation of Shh. *Nat. Neurosci.* **12**, 1248–1256.
- Ferri, A. L., Cavallaro, M., Braidà, D., Di Cristofano, A., Canta, A., Vezzani, A., Ottolenghi, S., Pandolfi, P. P., Sala, M., DeBiasi, S. et al. (2004). Sox2 deficiency causes neurodegeneration and impaired neurogenesis in the adult mouse brain. *Development* **131**, 3805–3819.
- Flandin, P., Zhao, Y., Vogt, D., Jeong, J., Long, J., Potter, G., Westphal, H. and Rubenstein, J. L. R. (2011). Lhx6 and Lhx8 coordinately induce neuronal expression of Shh that controls the generation of interneuron progenitors. *Neuron* **70**, 939–950.
- Frank-Kamenetsky, M., Zhang, X. M., Bottega, S., Guicherit, O., Wichterle, H., Dudek, H., Bumcrot, D., Wang, F. Y., Jones, S., Shulok, J. et al. (2002). Small-molecule modulators of Hedgehog signaling: identification and characterization of Smoothened agonists and antagonists. *J. Biol.* **1**, 10.
- Fuccillo, M., Rallu, M., McMahon, A. P. and Fishell, G. (2004). Temporal requirement for hedgehog signaling in ventral telencephalic patterning. *Development* **131**, 5031–5040.
- Fuccillo, M., Rutlin, M. and Fishell, G. (2006). Removal of Pax6 partially rescues the loss of ventral structures in Shh null mice. *Cereb. Cortex* **16 Suppl.** **1**, i96–i102.
- Gelman, D. M., Martini, F. J., Nóbrega-Pereira, S., Pierani, A., Kessaris, N. and Marín, O. (2009). The embryonic preoptic area is a novel source of cortical GABAergic interneurons. *J. Neurosci.* **29**, 9380–9389.
- Geng, X., Speirs, C., Lagutin, O., Inbal, A., Liu, W., Solnica-Krezel, L., Jeong, Y., Epstein, D. J. and Oliver, G. (2008). Haploinsufficiency of Six3 fails to activate Sonic hedgehog expression in the ventral forebrain and causes holoprosencephaly. *Dev. Cell* **15**, 236–247.
- Graham, V., Khudyakov, J., Ellis, P. and Pevny, L. (2003). SOX2 functions to maintain neural progenitor identity. *Neuron* **39**, 749–765.
- Guillemot, F. (2007). Spatial and temporal specification of neural fates by transcription factor codes. *Development* **134**, 3771–3780.
- Gulacsi, A. and Anderson, S. A. (2006). Shh maintains Nkx2.1 in the MGE by a Gli3-independent mechanism. *Cereb. Cortex* **16 Suppl.** **1**, i89–i95.
- Gutin, G., Fernandes, M., Palazzolo, L., Paek, H., Yu, K., Ornitz, D. M., McConnell, S. K. and Hébert, J. M. (2006). FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. *Development* **133**, 2937–2946.
- Hamdan, H., Liu, H., Li, C., Jones, C., Lee, M., deLemos, R. and Minoo, P. (1998). Structure of the human Nkx2.1 gene. *BBA* **1396**, 336–348.
- Hébert, J. M. and Fishell, G. (2008). The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. *Nat. Rev. Neurosci.* **9**, 678–685.
- Hébert, J. M. and McConnell, S. K. (2000). Targeting of cre to the Foxg1 (BF-1) locus mediates loxP recombination in the telencephalon and other developing head structures. *Dev. Biol.* **222**, 296–306.
- Jeong, Y., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M. and Epstein, D. J. (2006). A functional screen for sonic hedgehog regulatory elements across a 1 Mb interval identifies long-range ventral forebrain enhancers. *Development* **133**, 761–772.
- Jeong, Y., Leskow, F. C., El-Jaick, K., Roessler, E., Muenke, M., Yocum, A., Dubourg, C., Li, X., Geng, X., Oliver, G. et al. (2008). Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. *Nat. Genet.* **40**, 1348–1353.
- Kelberman, D., de Castro, S. C., Huang, S., Crolla, J. A., Palmer, R., Gregory, J. W., Taylor, D., Cavallo, L., Faienza, M. F., Fischetto, R. et al. (2008). SOX2 plays a critical role in the pituitary, forebrain, and eye during human embryonic development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **93**, 1865–1873.
- Kishi, M., Mizuseki, K., Sasai, N., Yamazaki, H., Shiota, K., Nakanishi, S. and Sasai, Y. (2000). Requirement of Sox2-mediated signalling for differentiation of early Xenopus neuroectoderm. *Development* **127**, 791–800.
- Kondoh, H. and Kamachi, Y. (2010). SOX-partner code for cell specification: Regulatory target selection and underlying molecular mechanisms. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 391–399.
- Lagutin, O. V., Zhu, C. C., Kobayashi, D., Topczewski, J., Shimamura, K., Puellas, L., Russell, H. R., McKinnon, P. J., Solnica-Krezel, L. and Oliver, G. (2003). Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. *Genes Dev.* **17**, 368–379.
- Markram, H., Toledo-Rodriguez, M., Wang, Y., Gupta, A., Silberberg, G. and Wu, C. (2004). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat. Rev. Neurosci.* **5**, 793–807.
- Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A. et al. (2007). Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat. Cell Biol.* **9**, 625–635.
- Matsushima, D., Heavner, W. and Pevny, L. H. (2011). Combinatorial regulation of optic cup progenitor cell fate by SOX2 and PAX6. *Development* **138**, 443–454.
- Miyagi, S., Masui, S., Niwa, H., Saito, T., Shimazaki, T., Okano, H., Nishimoto, M., Muramatsu, M., Iwama, A. and Okuda, A. (2008). Consequence of the loss of Sox2 in the developing brain of the mouse. *FEBS Lett.* **582**, 2811–2815.
- Nóbrega-Pereira, S., Kessaris, N., Du, T., Kimura, S., Anderson, S. A. and Marín, O. (2008). Postmitotic Nkx2-1 controls the migration of telencephalic interneurons by direct repression of guidance receptors. *Neuron* **59**, 733–745.
- Pan, Q., Li, C., Xiao, J., Kimura, S., Rubenstein, J., Puellas, L. and Minoo, P. (2004). In vivo characterization of the Nkx2.1 promoter/enhancer elements in transgenic mice. *Gene* **331**, 73–82.
- Pevny, L. H. and Nicolis, S. K. (2010). Sox2 roles in neural stem cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 421–424.
- Que, J., Luo, X., Schwartz, R. J. and Hogan, B. L. (2009). Multiple roles for Sox2 in the developing and adult mouse trachea. *Development* **136**, 1899–1907.
- Roessler, E. and Muenke, M. (2010). The Molecular Genetics of Holoprosencephaly. *Am. J. Med. Genet.* **154C**, 52–61.
- Sánchez-Camacho, C. and Bovolenta, P. (2008). Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* **135**, 3531–3541.
- Scott, C. E., Wynn, S. L., Sesay, A., Cruz, C., Cheung, M., Gomez Gavio, M. V., Booth, S., Gao, B., Cheah, K. S., Lovell-Badge, R. et al. (2010). SOX9 induces and maintains neural stem cells. *Nat. Neurosci.* **13**, 1181–1189.
- Sisodiya, S. M., Ragge, N. K., Cavalleri, G. L., Hever, A., Lorenz, B., Schneider, A., Williamson, K. A., Stevens, J. M., Free, S. L., Thompson, P. J. et al. (2006). Role of SOX2 mutations in human hippocampal malformations and epilepsy. *Epilepsia* **47**, 534–542.
- Sousa, V. H. and Fishell, G. (2010). Sonic hedgehog functions through dynamic changes in temporal competence in the developing forebrain. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **20**, 391–399.
- Suh, H., Consiglio, A., Ray, J., Sawai, T., D'Amour, K. A. and Gage, F. H. (2007). In vivo fate analysis reveals the multipotent and self-renewal capacities of Sox2+ neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* **1**, 515–528.
- Sur, M. and Rubenstein, J. L. (2005). Patterning and plasticity of the cerebral cortex. *Science* **310**, 805–810.
- Sussel, L., Marín, O., Kimura, S. and Rubenstein, J. L. (1999). Loss of Nkx2.1 homeobox gene function results in a ventral to dorsal molecular respecification within the basal telencephalon: evidence for a transformation of the pallidum into the striatum. *Development* **126**, 3359–3370.
- Taranova, O. V., Magness, S. T., Fagan, B. M., Wu, Y., Surzenko, N., Hutton, S. R. and Pevny, L. H. (2006). SOX2 is a dose-dependent regulator of retinal neural progenitor competence. *Genes Dev.* **20**, 1187–1202.

- Toledo-Rodriguez, M., Goodman, P., Illic, M., Wu, C. and Markram, H.** (2005). Neuropeptide and calcium-binding protein gene expression profiles predict neuronal anatomical type in the juvenile rat. *J. Physiol.* **567**, 401-413.
- Wegner, M.** (2010). All purpose Sox: The many roles of Sox proteins in gene expression. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 381-390.
- Wegner, M. and Stolt, C. C.** (2005). From stem cells to neurons and glia: a Soxist's view of neural development. *Trends Neurosci.* **28**, 583-588.
- Xu, Q., Wonders, C. P. and Anderson, S. A.** (2005). Sonic hedgehog maintains the identity of cortical interneuron progenitors in the ventral telencephalon. *Development* **132**, 4987-4998.
- Xu, Q., Guo, L., Moore, H., Waclaw, R. R., Campbell, K. and Anderson, S. A.** (2010). Sonic hedgehog signaling confers ventral telencephalic progenitors with distinct cortical interneuron fates. *Neuron* **65**, 328-340.
- Zappone, M. V., Galli, R., Catena, R., Meani, N., De Biasi, S., Mattei, E., Tiveron, C., Vescovi, A. L., Lovell-Badge, R., Ottolenghi, S. et al.** (2000). Sox2 regulatory sequences direct expression of a (beta)-geo transgene to telencephalic neural stem cells and precursors of the mouse embryo, revealing regionalization of gene expression in CNS stem cells. *Development* **127**, 2367-2382.
- Zhao, L., Zevallós, S. E., Rizzoti, K., Jeong, Y., Lovell-Badge, R. and Epstein, D. J.** (2012). Disruption of SoxB1-dependent Sonic hedgehog expression in the hypothalamus causes septo-optic dysplasia. *Dev. Cell* **22**, 585-596.

Shh/Boc Signaling Is Required for Sustained Generation of Ipsilateral Projecting Ganglion Cells in the Mouse Retina

Luisa Sánchez-Arrones,^{1,2,3*} Francisco Nieto-Lopez,^{1,2,3*} Cristina Sánchez-Camacho,^{2,3} M. Isabel Carreres,⁴ Eloisa Herrera,⁴ Ami Okada,⁵ and Paola Bovolenta^{1,2,3}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain,

²CIBER de Enfermedades Raras, Madrid 28049, Spain, ³Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid 28002, Spain, ⁴Instituto de Neurociencias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante 03550, Spain, and ⁵Stanford University, Department Neurology, Stanford, California 94305

Sonic Hedgehog (Shh) signaling is an important determinant of vertebrate retinal ganglion cell (RGC) development. In mice, there are two major RGC populations: (1) the Islet2-expressing contralateral projecting (c)RGCs, which both produce and respond to Shh; and (2) the Zic2-expressing ipsilateral projecting RGCs (iRGCs), which lack Shh expression. In contrast to cRGCs, iRGCs, which are generated in the ventrotemporal crescent (VTC) of the retina, specifically express Boc, a cell adhesion molecule that acts as a high-affinity receptor for Shh. In *Boc*^{−/−} mutant mice, the ipsilateral projection is significantly decreased. Here, we demonstrate that this phenotype results, at least in part, from the misspecification of a proportion of iRGCs. In *Boc*^{−/−} VTC, the number of Zic2-positive RGCs is reduced, whereas more Islet2/Shh-positive RGCs are observed, a phenotype also detected in *Zic2* and *Foxd1* null embryos. Consistent with this observation, organization of retinal projections at the dorsal lateral geniculate nucleus is altered in *Boc*^{−/−} mice. Analyses of the molecular and cellular consequences of introducing *Shh* into the developing VTC and *Zic2* and *Boc* into the central retina indicate that Boc expression alone is insufficient to fully activate the ipsilateral program and that Zic2 regulates *Shh* expression. Taking these data together, we propose that expression of *Boc* in cells from the VTC is required to sustain Zic2 expression, likely by regulating the levels of Shh signaling from the nearby cRGCs. Zic2, in turn, directly or indirectly, counteracts *Shh* and *Islet2* expression in the VTC and activates the ipsilateral program.

Introduction

Retinal ganglion cells (RGCs), the output neurons of the vertebrate retina, relay information to the brain regions that mediate image-forming vision. Binocular vision differs among vertebrates and is dictated by the proportion of crossing and noncrossing RGC axons at the chiasm. Although local guidance factors are critical to midline fiber segregation, axon competence to respond to these cues is imposed by cell-autonomous programs that specify RGC identity (Erskine and Herrera, 2007).

The vast majority of RGCs in mice, which have a relatively small binocular field, project to the contralateral side of the brain (cRGCs), whereas a small proportion projects to the ipsilateral side (iRGCs). iRGCs are generated during early embryonic development only in the ventrotemporal crescent (VTC), whereas cRGCs are specified throughout the retina, including in the VTC, where they intermingle with the iRGCs starting from E17 (Dräger, 1985).

The transcriptional network that establishes cRGC identity involves the POU-domain Brn3b and the LIM-homeodomain Islet2 (Mu and Klein, 2004), both of which contribute to axon-crossing behavior (Erkman et al., 2000; Wang et al., 2002; Pak et al., 2004). Committed RGCs express the morphogen Shh under the control of Brn3b (Mu et al., 2004). Shh, in turn, signals to the nearby cells propagating the wave of RGC differentiation, their final number, maturation (Esteve and Bovolenta, 2006), and their axon extension along the proximal visual pathway (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2009). Shh, produced by midline cells at the chiasm borders, further help guide visual axons by constraining their growth along the anteroposterior axis (Trousse et al., 2001; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008).

The genetic program involved in the generation of iRGC differs from that of cRGCs and requires Foxd1-mediated activation of *Zic2* (Herrera et al., 2003; Herrera et al., 2004), a zinc-finger transcription factor. Zic2 activates the expression of ipsilaterality effectors, including the EphB1 receptor and the serotonin transporter (Sert) (Lee et al., 2008; García-Frigola and Herrera, 2010).

Received April 30, 2012; revised March 20, 2013; accepted March 22, 2013.

Author contributions: E.H. and P.B. designed research; L.S.-A., F.N.-L., C.S.-C., M.I.C., and A.O. performed research; A.O. contributed unpublished reagents/analytic tools; L.S.-A., F.N.-L., C.S.-C., E.H., and P.B. analyzed data; L.S.-A. and P.B. wrote the paper.

This work was supported by Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN) Grant BFU2010-16031, Comunidad Autónoma de Madrid Grant S2010/BMD-2315, a CIBER de Enfermedades Raras grant to P.B.; and Spanish MICINN Grant BFU2011-16563 and CONSOLIDER-Ingenio Program Grant CDS2007-023 to E.H. We thank Elisa Martí for critical reading of the manuscript; Celia Vegar for mice genotyping; Dr. Corey Harwell for providing some of the *Boc*^{−/−} embryos used in the revision of this manuscript; and the RIKEN BioResource Center (Japan) for the Zic2 mutant mice.

*L.S.-A. and F.N.-L. contributed equally to this work.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Dr. Paola Bovolenta, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas-UAM, c/Nicolás Cabrera, 1, Cantoblanco, Madrid 28049, Spain; E-mail: pbovolenta@cbm.uam.es.

C. Sánchez-Camacho's present address: Universidad Europea de Madrid, c/ Tajo, s/n Villaviciosa de Odón, Madrid 28670, Spain.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.2083-12.2013

Copyright © 2013 the authors 0270-6474/13/338596-12\$15.00/0

In contrast to cRGCs, iRGCs lack Shh expression but specifically express Boc (brother of Cdon) (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008), a high-affinity Shh receptor (Tenzen et al., 2006) that mediates the Shh role in axon guidance (Okada et al., 2006). Indeed, it has been recently proposed that Boc expression by iRGCs is required to prevent ipsilateral axons from crossing the optic chiasm midline (Fabre et al., 2010). However, there is also evidence that Shh/Boc signaling contributes to cell fate specification (Bergeron et al., 2011) and that Shh and Zic2 could influence each others' expression during forebrain patterning (Brown et al., 2003; Sanek et al., 2009). Here we have investigated whether Boc/Shh signaling participates in iRGC generation, and we have further explored Boc implication in iRGC axonal growth by analyzing the development of the ipsilateral component in the visual system of *Boc*^{-/-} mice and the effect that Zic2 loss-of-function and Shh gain-of-function has in VTC development. Our study demonstrates that a regulatory loop between Zic2 and Boc-mediated Shh signaling is an important mechanism to maintain the appropriate number of iRGC in the retina. Disruption of this regulatory loop shifts RGC production in the VTC toward a cRGC fate, with consequent alterations in retinal fiber organization at one of their main targets, the dorsal lateral geniculate nucleus (dLGN).

Materials and Methods

Animals. *Boc*^{-/-}, *Zic2*^{kd/kd}, and *Foxd1*^{-/-} mice were generated and bred as described (Hatini et al., 1996; Nagai et al., 2000; Okada et al., 2006). *Boc*^{-/-} animals were maintained in both the CD1 and C57BL background. Analysis of the two strains led to comparable results; thus, the two lines were interchangeably used in this study. Of note, in the albino strain, the number of Zic2-positive cells in the VTC was slightly inferior to that observed in the C57BL background, possibly in line with recent observations on albino mice (Rebsam et al., 2012). These changes, however, were not significant. Embryos were obtained from homozygous or heterozygous timed mating. The phenotype of homozygous null embryos was always compared with littermates or age-matched wild-type (WT) derived from heterozygous mating. For electroporation experiments, C57BL embryos were used. The date of the vaginal plug was considered E0.5. Animals used in the study were of either sex. Animals were collected and handled following the Spanish (RD 223/88), European (86/609/ECC), and American (National Research Council, 1996) regulations.

DNA plasmids. The coding sequence of the mouse *Boc* gene was inserted in frame in the pEGFPN1 vector to generate a *Boc::GFP* fusion protein (Okada et al., 2006). The N-Shh::GFP construct was kindly provided by Prof. A.P. McMahon (Harvard University, Cambridge, MA). The coding sequences of the human *ZIC2* and mouse *Shh::GFP* and *Boc::GFP* were subcloned in the pCAG plasmid for electroporations (García-Frigola et al., 2007).

In situ hybridization and immunohistochemistry. E13 to E15 embryos were fixed by immersion in 4% PFA in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2, for 3 h. Embryos older than E15 and postnatal (P) animals were transcardially perfused with 4% PFA. Brains were dissected, postfixed for 2–12 h at 4°C, washed in PBS, cryoprotected in 30% sucrose solution in phosphate buffer, and sectioned at 15 μm thickness in the frontal plane. Sections were hybridized as described previously (Esteve et al., 2003), using the following digoxigenin-labeled specific probes: *Shh*, *Zic2*, *Islet2*, *Sert*, and *Boc*. Immunostaining was performed as described previously (Esteve et al., 2003) with the following antibodies: rabbit anti-Zic2 (1:5000; Millipore), goat anti-Cdon (1:100; R&D Systems), rabbit anti-GFP (1:1000; Invitrogen), goat anti-Brn3b (1:500; Santa Cruz Biotechnology), guinea-pig anti-Islet2 (1:8000, a kind gift of Prof. T. Jessell), and rabbit anti-Phospho-Histone H3 (1:2000; Cell Signaling Technology). Secondary antibodies were conjugated to Alexa-594 and Alexa-488 (1:500; Invitrogen) or to biotin followed by streptavidin-POD (1:500; Jackson ImmunoResearch Laboratories) and revealed with DAB. Sections were counterstained with DAPI (1 μg/ml, Vector

Laboratories). Distribution of apoptotic cells was determined by TUNEL staining using the In Situ Cell Death Detection Kit, POD (Roche) following the manufacturer's directions.

Anterograde and retrograde labeling of retino-geniculate projections. WT and *Boc*^{-/-} animals (E16, E18, and P1–P4) were fixed in 4% PFA from 1.5 h to overnight at 4°C and then washed in PBS. Small crystals of Dil (D282, Invitrogen) were implanted unilaterally into the exposed optic disc, as described (Godement et al., 1987). Heads were incubated at 37°C in PBS containing 0.4% PFA for 2–3 weeks. Brains were isolated, and the optic chiasm was viewed and photographed under fluorescent stereomicroscopy. Brains were then embedded in 4% agarose and sectioned with a vibratome (Leica) at 100 μm thickness in the frontal or horizontal plane. Sections were analyzed with a Leica DM microscope equipped for epifluorescence. Alternatively, P12–P30 WT and *Boc*^{-/-} mice were anesthetized with isoflurane (Isovet, reference 240055 Centauro), and eyes were filled with 0.5 μl of cholera toxin subunit B (CTB) conjugated to Alexa-488 (green, right eye) or Alexa-594 (red, left eye; Invitrogen) as described previously (Rebsam et al., 2009). After 48 h, mice were anesthetized and perfused with 4% PFA. Brains were embedded in 4% agarose and sectioned in 50–60 μm frontal or horizontal sections. These were mounted and analyzed by confocal microscopy. For retrograde labeling, E17 embryos were traced using Dextran-Rhodamine (3000 MW; Invitrogen), as described previously (Herrera et al., 2003), but tissue was incubated at 37°C to allow complete backfilling.

In utero and ex utero electroporation. E13 pregnant mice were anesthetized with isoflurane as above and DNA introduced by electroporation *in utero* as described previously (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Different DNA solutions (2 μg/μl; pCAG-GFP alone or combined with either pCAG-Boc, pCAG-Zic2, and pCAG-Foxd1 or pCAG-Shh::GFP and pCAG-Boc::GFP alone) were injected into one eye of each embryo through the uterine wall before electroporation. Mice were sutured and allowed to recover and develop for 5 d, at which time E18.5 embryos were collected and fixed with 4% PFA. Retinas were then removed, flat-mounted, and analyzed by fluorescent microscopy. Brains were isolated, and the trajectory of the electroporated RGC axons were viewed and photographed with a fluorescence stereomicroscope. Brains were then processed for cryotome or vibratome sectioning as described above. For *ex utero* electroporations, E13 WT embryos were collected, maintained in cold PBS, and different DNA solutions (2 μg/μl; pCAG-GFP alone or combined with either pCAG-Boc, pCAG-Zic2) injected into one eye before electroporation. Afterward, the retinas were dissected and incubated in tissue culture dishes (Nunc) with DMEM/F12 (Invitrogen) and N-2 supplement (1%, Invitrogen) overnight at 37°C.

qRT-PCR. E13 WT retinas were electroporated *ex utero* and maintained in culture as described above. After 24 h, the GFP-positive regions from eight positive retinas were collected under fluorescence microscopy and processed for qRT-PCR as described previously (Beccari et al., 2012). Total RNA was extracted and purified following standard commercial protocols (RNeasy Mini Kit, QIAGEN). RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems). The qPCR was performed using Power SYBR Green Master Mix following the manufacturer's protocol (Applied Biosystems) in a 25 μl reaction mixture containing 2 μl of cDNA. Primers were designed using PrimerExpress (Applied Biosystems), and sequences are available upon request. In all cases, the length of the amplicons was between 100 and 150 bp. Transcript levels were normalized to 18S rRNA levels and their level compared with that of GFP-electroporated controls. Data were analyzed with the Mann–Whitney test and considered significant with $p < 0.05$.

Image and statistical analysis. Tissue was analyzed with an M205FA stereomicroscope or a DM CTR5000 microscope equipped for fluorescence microscopy and photographed with DFC350F and DFC500 cameras (Leica Microsystems). Comparison of the VTC phenotype of *Boc*^{-/-} animals was performed using central sections taken at the level of the optic nerve. Care was taken to compare equivalent sections for each of the stages analyzed and to provide in each one of the relevant figures an image of either the second or third section through the optic nerve for either WT or mutant animals. The limit of the VTC extension was defined for each stage using Zic2 immunostaining or hybridization on serial sections

from WT embryos. The extent of positive staining was used to draw a mask (e.g., see Figs. 4A, 8A). The mask was then reported on the equivalent mutant section as shown in Figures 4B and 8B and used to compare and quantify labeling in the two regions. The number of *Zic2*⁺, *Islet2*⁺, and *Brn3b*⁺ cells was determined by counting positive nuclei in the VTC from four central sections of both eyes for each one of the embryos analyzed. A minimum of four or five embryos was analyzed in each case. The ipsilateral index was calculated as described by dividing the fluorescent intensity in the ipsilateral optic tract by the sum of the fluorescent intensity in both tracts (Erskine et al., 2011). Distribution of green and red fluorescent pixels in the dLGN was determined in confocal images using a LEICA TCS SP-5, taking care of comparing sections at the same anteroposterior axial level. Quantitative analysis of ipsilateral projections was performed using Image J (National Institutes of Health). Differences between calculated averages were considered significant as follows: **p* ≤ 0.05, ***p* < 0.01, and ****p* < 0.001 (Student's *t* test).

Results

The ipsilateral projection is reduced in the absence of *Boc*

Boc is a cell surface glycoprotein that contains immunoglobulin and fibronectin domains. *Boc*, the related *Cdon*, and their *Drosophila* counterparts *iHog* and *Boi* bind Shh and can also interact with the Hh receptor *Patched* (*Ptch*), indicating that they can function as coreceptors in Hh signaling (for review, see Sánchez-Arrones et al., 2012). *Boc* has an established function in axon guidance (Connor et al., 2005; Okada et al., 2006), and in its absence Shh-sensitive commissural axons are misrouted (Okada et al., 2006). In the visual system, *Boc* is expressed in iRGCs, whereas its ligand Shh localizes to the midline preoptic region and is also secreted by the cRGCs (Trousse et al., 2001; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). This distribution, together with functional experiments and the observation that *Boc*^{−/−} embryos have a reduced ipsilateral component, led to the idea that *Boc*/Shh signaling could determine the laterality of RGC axons, functioning in parallel to *EphB1*/*ephrinB2* signaling (Fabre et al., 2010), an established mechanism for the sorting of iRGC axons at the optic chiasm (Williams et al., 2003).

Using complete unilateral Dil tracing of visual axons, we have confirmed that, in the absence of *Boc*, the ipsilateral projection is reduced at embryonic (Fig. 1A,B) and postnatal stages in both the optic tract (Fig. 1C,D) and dLGN (Fig. 1E,F'), in which the amount of innervation appeared comparatively less abundant than that observed in the optic tract at the same age, suggesting a possible slower growth of the mutant axons. An unusual accumulation of growth cones in both the chiasm (not shown) and the initial portion of the ipsilateral tract (Fig. 1G,H) provided further support to this idea. Compared with WT, the reduction of fiber in the mutant ipsilateral tract was estimated to be between 40 and 45%, according to the analysis of the ipsilateral index (Fig. 1I), a semiquantitative method that compares the relative fluorescence in the ipsilateral optic tract to the sum of fluorescence intensity in both tracts (Erskine et al., 2011).

Boc acts downstream of *Zic2* but does not suffice to activate the ipsilateral program

Boc is expressed in the VTC, with higher intensity in the *Zic2*-positive cells (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Fabre et al., 2010) and in the ciliary marginal zone (CMZ) (Fig. 2A–C). In *Boc* absence, ipsilateral projections are reduced, suggesting that *Boc*, as *EphB1*, could act downstream of *Zic2*. To address this possibility, we analyzed *Boc* distribution in *Zic2*^{kd/kd} and *Foxd1*^{−/−} mice, as *Foxd1* has been shown to act upstream of *Zic2* in the specification of the ipsilateral program (Carreres et al., 2011). Indeed, *Boc* was absent from the VTC of *Zic2*^{kd/kd} (Fig. 2E) and *Foxd1*^{−/−} (data not shown) embryos but still observed in the

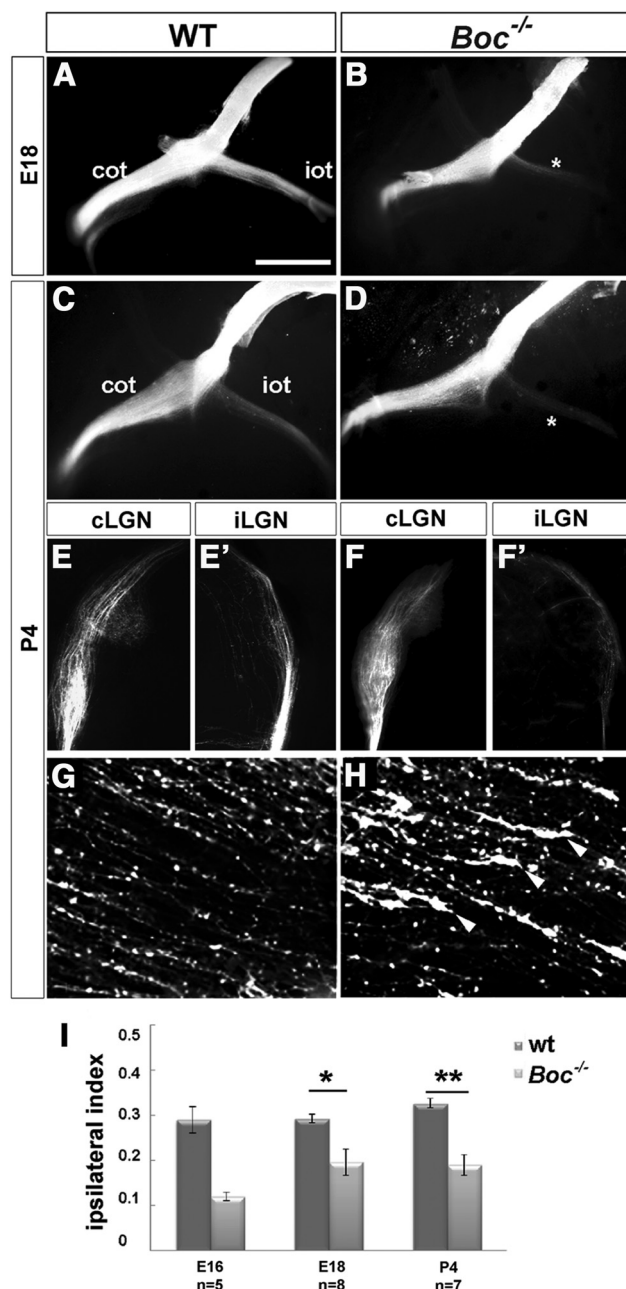


Figure 1. *Boc*^{−/−} mice present a reduction of uncrossed retinal projections. **A–H**, Ventral views of the intact brains (**A–D**) and frontal (**E–F'**) or horizontal (**G,H**) vibratome sections through the contralateral and ipsilateral dLGN (**E–F'**) and optic chiasm (**G,H**) from E18 and P4 WT and *Boc*^{−/−} animals (as indicated in the panels) with unilateral Dil filling of the optic disk to visualize visual fiber trajectory. There is strong reduction of projecting fibers in the ipsilateral lateral geniculate nucleus (iLGN) of the mutants. *Ipsilateral reduction. **F**, Arrowheads indicate growth cones in the initial portion of the mutant ipsilateral optic tract. **I**, The graph compares the values of the ipsilateral index in WT and *Boc*^{−/−} mice at embryonic and postnatal stages. The number of analyzed animals is indicated in the graph for each stage. **p* < 0.05 (Student's unpaired *t* test). ***p* < 0.01 (Student's unpaired *t* test). cLGN, Contralateral lateral geniculate nucleus; cot, contralateral optic chiasm; iot, ipsilateral optic tract. Scale bars: **A–D**, 1000 μm; **E, F**, 500 μm.

CMZ, where its homolog *Cdon* is also expressed (Fig. 2D,F). These data support that *Boc* expression is downstream of *Zic2* and/or *Foxd1*.

EphB1, the main *Zic2* target involved in determining iRGC behavior at the midline, is sufficient to force contralateral axons into an ipsilateral trajectory (Petros et al., 2009). If *Boc* acts in a

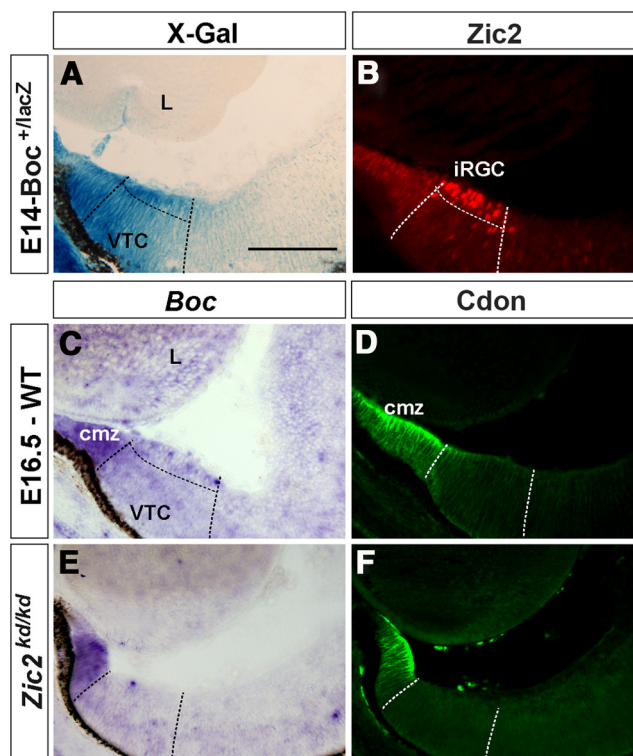


Figure 2. *Boc* expression is downregulated in the VTC of *Zic2*^{kd/kd} embryos. Frontal cryostat sections from E14.5 *Boc*^{+/lacZ} and E16.5 WT and *Zic2*^{kd/kd} central retinas reacted with X-gal histochemistry, hybridized with probes for *Boc* or immunostained with antibodies against *Zic2* and the related *Cdon*. **A, B**, The specific expression of *Boc* in the VTC is particularly abundant in the *Zic2*-positive domain. **C–F**, *Boc* expression is absent in *Zic2*^{kd/kd} embryos but maintained in the CMZ where *Cdon* is also localized. cmz, Ciliary marginal zone; L, lens. Scale bar, 200 μm.

similar manner, ectopic expression of *Boc* should be sufficient to induce an ipsilateral behavior in cRGC, as observed when *EphB1*, *Zic2*, or *Foxd1* is overexpressed in cRGCs (García-Frigola et al., 2008; Lee et al., 2008; Petros et al., 2009; Carreres et al., 2011). To test this possibility we compared the efficiency with which *Boc*, *Zic2*, *Foxd1*, or a combination of *Zic2*⁺ *Boc* or *Foxd1*⁺ *Boc* change the trajectory of cRGC axons from crossed to uncrossed, when electroporated into the eye of E13 WT embryos, which were subsequently analyzed at E18. As previously reported (García-Frigola et al., 2007; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008), electroporations at this stage mostly targeted RGCs in central retina (Fig. 3A). When a control pCAG-GFP plasmid was expressed, the entire population of GFP-positive axons crossed the midline with very rare exceptions in which individual axons were observed in the contralateral optic nerve or ipsilateral optic tract (Fig. 3B). The vast majority of cRGCs with forced expression of *Boc* showed a normal crossed behavior (Fig. 3C,D), whereas a few axons consistently adopted alternative routes, either entering the contralateral optic nerve or, to a lower extent, the ipsilateral optic tract (Fig. 3D',D''), as reported (Fabre et al., 2010). This proportion, however, represented only a small fraction of the targeted population (Fig. 3G), in contrast to the significant amount of axons that adopt an uncrossed trajectory upon pCAG-*Zic2* (Fig. 3E,G) or pCAG-*Foxd1* (data not shown) forced expression. Notably, coelectroporation of *Boc* with either *Zic2* (Fig. 3F) or *Foxd1* (data not shown) did not increase the proportion of uncrossed fibers observed with *Zic2* alone (Fig. 3G), strongly supporting that *Boc* alone is insufficient to switch the axonal laterality of already committed cRGCs, forcing them to grow ipsilaterally.

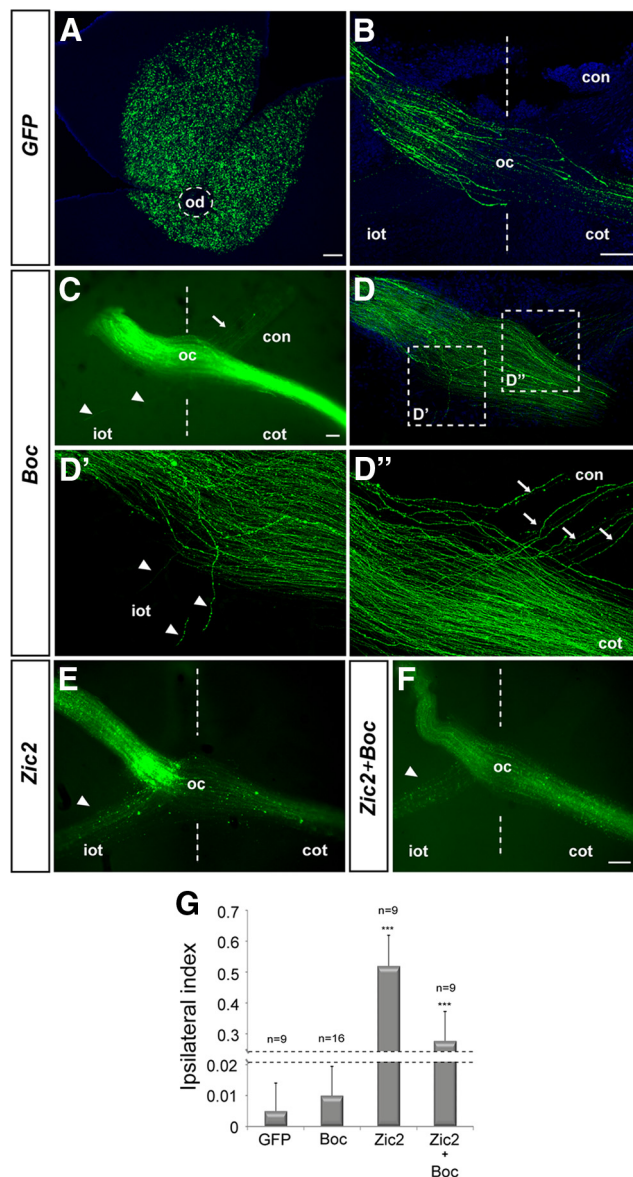


Figure 3. *Boc* is insufficient to activate the ipsilateral program. **A–F**, Confocal images of flat-mounted electroporated retina (**A**) and representative sections of the optic chiasm (**B–F**) from E18 embryos electroporated at E13 with a plasmid expressing GFP alone (**A, B**), or GFP with *Boc* (**C, D**), *Zic2* (**E**), or *Zic2* and *Boc* (**F**). Electroporations mostly targeted the central retina (**A**). **D', D''**, High-magnification views of the areas boxed in **D**. In embryos electroporated with *Boc*, most axons (**C, D**) cross the midline (dotted lines), whereas a few axons grow into the ipsilateral optic tract (**D', D''**, arrowheads) and in larger numbers in the contralateral optic nerve (**D''**, arrows). **G**, The graph compares the values of the ipsilateral index in embryos electroporated with the different constructs. The number of analyzed animals is indicated on top of each bar. ****p* < 0.001, compared with GFP (Student's unpaired *t* test). od, Optic disc; con, contralateral optic nerve; oc, optic chiasm; iot, ipsilateral optic tract; cot, contralateral optic tract. Scale bar, 100 μm.

Boc is required to maintain an appropriate number of *Zic2*⁺ iRGCs in the VTC

Together, our data indicate that *Boc* inactivation affects only a proportion of the ipsilateral fibers and *Boc* alone is insufficient to induce a substantial uncrossed behavior in cRGC. We thus considered that these observations would better fit the idea that *Boc*/Shh signaling is involved in iRGC specification, similarly to what has been reported for ventral neurons in the zebrafish neural tube (Bergeron et al., 2011). Shh is secreted from the adjacent cRGCs (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). This raises the possibility that, as observed during forebrain patterning (Brown et al.,

2003; Sanek et al., 2009), Shh could activate *Zic2* expression in iRGC. Notably, Shh receptors, such as Gas1 (Lee et al., 2001) and Cdo (Fig. 2D), which exhibit functional redundancy with Boc in some tissues (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011), are coexpressed in the CMZ, but only Boc is found in the VTC (Fig. 2A) (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008; Fabre et al., 2010). Therefore, the loss of *Boc* could be expected to have a significant impact on Shh reception by the iRGC.

To investigate this possibility, we compared the distribution of *Zic2* mRNA and protein and of its direct downstream target *Sert* (García-Frigola and Herrera, 2010) in WT and *Boc*^{−/−} retinas from E16, E18, and newborn animals (Fig. 4). *Zic2* expression starts to wane at E17, but it is still detectable at postnatal stages in WT animals (Fig. 4A,E,I). Quantification of *Zic2*⁺ cells in the VTC revealed no significant difference between WT and *Boc*^{−/−} E16 embryos (Fig. 4M), although in *Boc*^{−/−} embryos positive cells appeared clustered toward the CMZ (Fig. 4B). This clustering was more evident at later embryonic and early postnatal stages, when *Zic2* and *Sert*-positive cells were also significantly decreased compared with WT (Fig. 4E–M). This decrease could be a consequence of cell death or of a change in cell proliferation. However, no TUNEL-positive cells were observed in this region between E18 and P1 in WT or in *Boc*^{−/−} retinas (not shown). Similarly, there was no difference in the number of phospho-histone H3-positive cells between WT and mutants retinas, suggesting that changes in cell death and proliferation are unlikely causes of the observed phenotype.

Boc is required to restrain *Islet2*/Shh expression within the VTC

To confirm that decreased *Zic2* staining did not reflect cell loss, we stained retinal sections from WT and *Boc*^{−/−} embryonic and postnatal animals with antibodies against Brn3b, which labels most RGCs, including those of the VTC (Quina et al., 2005). The total number of RGCs in the VTC of embryonic and newborn mice was similar in WT and *Boc* mutants (Fig. 5A,A',E,E',I,I',P).

When *Islet2* is genetically inactivated, an abnormally high number of *Zic2*⁺ cells accumulates in the VTC with a consequent increase of the ipsilateral projections, suggesting that *Islet2* represses *Zic2* expression in the VTC, thereby controlling the magnitude of the uncrossed component (Pak et al., 2004). We thus reasoned that invariance of Brn3b⁺ cells associated with a loss of *Zic2*⁺ cells could reflect the existence of a converse regulation in which reduced *Zic2* levels would favor the generation of *Islet2*⁺ cells. In the VTC, *Islet2*⁺ cRGCs are normally generated from E17 to P1 (Dräger and Olsen, 1980; Dräger, 1985), intermingling with the *Zic2*⁺ cells (Fig. 5B,F,J). Double labeling with *Zic2* and *Islet2* antibodies and *in situ* hybridization against *Islet2* revealed that, in the *Boc*^{−/−} retinas of E18 and P0 animals, the number of *Islet2*⁺ cells in the VTC was significantly increased, in parallel with the progressive decrease of *Zic2*⁺ cells (Fig. 5F,F',G,G',J,J',K,K',P). Consistent with this observation and the notion that *Shh* is expressed in cRGC (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008), *Shh* mRNA was also abnormally localized to the *Boc*^{−/−} VTC at these ages (Fig. 5D,D',H,H',L,L').

Together, these data suggested that part of the *Zic2*⁺ iRGCs in the VTC are respecified as *Islet2*⁺ cRGCs. If this is the case, contralateral projections from the VTC should be increased in the mutant retinas. To verify this possibility, we retrograde labeled visual projections of E17 embryos by injecting Dextran-Rhodamine in the optic tract of exposed brain preparations (Herrera et al., 2003). Analysis of flat-mounted retinal prepara-

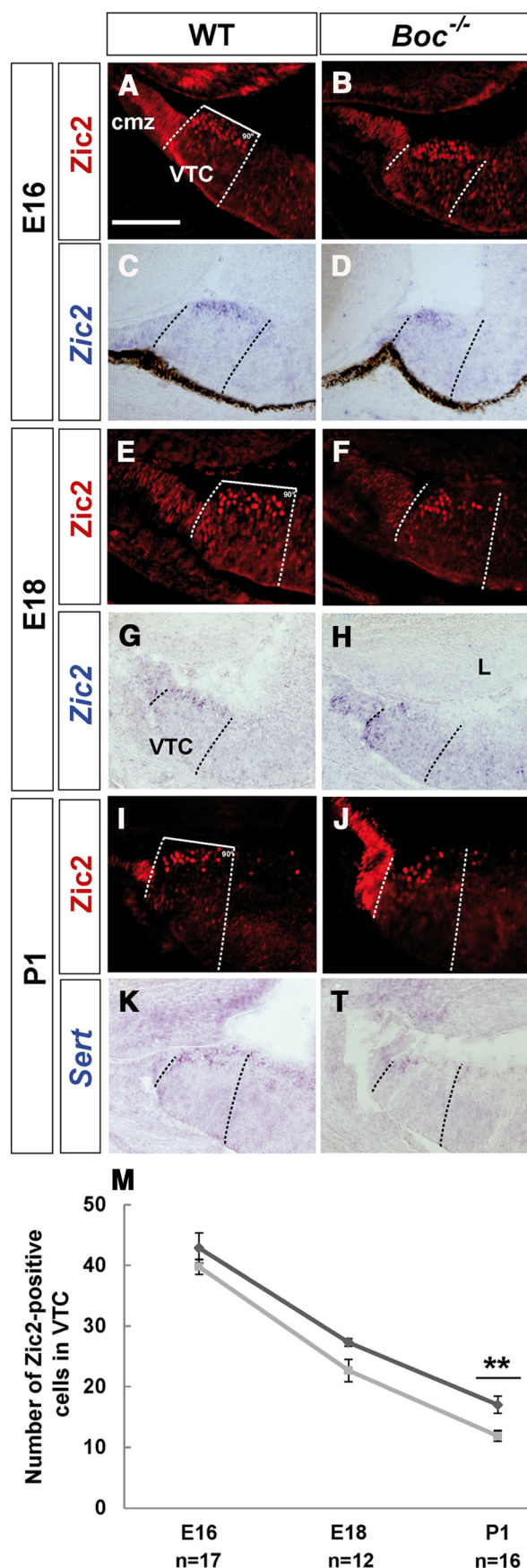


Figure 4. A–L, Boc is required to maintain the appropriate number of *Zic2*-positive iRGCs. Frontal cryostat sections from E16 (A–D), E18 (E–H), and P1 (I–L) WT and *Boc*^{−/−} central

tions confirmed that in WT mice the majority of backfilled neurons localized to the ipsilateral VTC, whereas only a few backfilled cells localized to the contralateral VTC (Fig. 5M–O), as expected for this stage when cRGCs in the VTC are just beginning to form. In *Boc* mutants instead, there was a statistically significant reduction of backfilled cells localized to the ipsilateral VTC associated with an increase of backfilled and *Zic2*⁺ cells in the contralateral VTC (Fig. 5M'–O',Q). These data support that, in the absence of *Boc*, the generation of RGCs in the VTC is shifted in favor of the cRGC type.

The organization of retinal projections at the dLGN is altered in the absence of *Boc*

The ipsilateral and contralateral projections from the VTC terminate in well-defined regions of the dLGN. Ipsilateral projections form a defined patch in the dorsomedial dLGN, whereas contralateral projecting VTC neurons cluster in a small region at the dorsal-most tip of the dLGN (Jaubert-Miazza et al., 2005; Rebsam et al., 2009). If *Zic2*⁺ iRGCs in the *Boc*^{−/−} VTC are indeed respecified as *Islet2*⁺ cRGCs, these two fields should be respectively reduced and increased in *Boc*^{−/−} animals.

To address this issue, we labeled each eye with CTB-AlexaFluor dyes and analyzed the distribution of retinal projections in the dLGN at P12, P18, and P30, which collectively represent the period in which the terminal field of crossed and uncrossed projections become finally segregated (Jaubert-Miazza et al., 2005). As previously described (Jaubert-Miazza et al., 2005; Rebsam et al., 2009), ipsilateral projections (red) in P12 WT animals (*n* = 4) formed a small and defined patch in the dorsomedial dLGN surrounded by the contralateral projections (green), which occupy most of the dLGN with a small cluster at the dorsomedial tip representing cRGC projections from the VTC (Fig. 6A–C). In *Boc* mutants instead, ipsilateral projections in the dorsomedial dLGN were visibly reduced (Fig. 6E; *n* = 4 by 32%), whereas the dorsal cluster of contralateral axons was more intense (Fig. 6D). Notably, confocal analysis of green and red fluorescence distribution revealed a good deal of overlap between projections from the left and right eye in the dorsal dLGN (Fig. 6D–F). This was confirmed by analysis of fluorescence distribution in the *z* plane (reslice profile). In WT, ipsilateral projections were clustered in a well-defined spot of ~175 μm of width with a relatively homogeneous pixel distribution and a minimal overlap with crossed projections (green) from the other eye (Fig. 6C'). In *Boc* mutants instead, red channel fluorescence (ipsilateral) was scattered with an uneven intensity in a wider region (~400 μm) that extensively overlapped with the green spectrum of the crossed projections from the other eye (Fig. 6F'). This overlap could reflect delayed segregation of ipsilateral and contralateral fibers, the presence of misrouted ipsilateral fibers as previously suggested (Fabre et al., 2010), or even contralateral sprouts on unoccupied dorsocentral dLGN neurons.

Compared with WT (*n* = 3), a smaller ipsilaterally targeted area was still observed in *Boc*^{−/−} mice at P18 (*n* = 3; by 33%; Fig. 6G–J,L), and crossed and uncrossed projections were still intermingled (Fig. 6I',L') as confirmed by confocal analysis of red

and green fluorescence in the *z* plane. Peaks of red fluorescence (ipsilateral) were detected in regions that in WT are normally occupied only by crossed projections (Fig. 6I',L'), including the dorsal-most region of the dLGN (Fig. 6, compare I',L'), in which late-born, contralateral projecting VTC neurons originate (Rebsam et al., 2009). Green (contralateral) fluorescence was also abnormally observed in the dorsocentral *Boc*^{−/−} dLGN, although this was less defined (Fig. 6I',L'). Analysis of P30 animals (*n* = 4), when activity-dependent segregation is fully accomplished, confirmed that, in the *Boc*^{−/−} dLGN, the ipsilateral field was reduced in medial areas (Fig. 7A,B,E,F), whereas it appeared more disperse and intermingled with contralateral projections in caudal areas compared with WT animals (Fig. 7, compare C,D,G,H and their respective reslice profiles). Nevertheless, the overall area occupied by ipsilateral axons was reduced of ~36.5% in the *Boc* mutants. By contrast, the cluster of cRGCs terminals at the dorsal tip of the dLGN was more evident than in WT, as better appreciated in the respective reslice profiles (Fig. 7A,C,E,G, reslices 1).

Together, these data suggest that, in *Boc*^{−/−} mice, the ipsilateral domain of the dLGN is only partially innervated and further receives few fibers from the contralateral eye, which could represent abnormally sorted uncrossed projections (Fabre et al., 2010). Most notably, and supporting a shift in identity of RGCs in the VTC, *Boc*^{−/−} animals present an increased clustering of fibers in the region where late-born VTC cRGCs project.

A feedback regulatory loop between *Zic2* and *Shh* signaling in the VTC

Together, the above data demonstrate that *Boc* is required for the generation of an appropriate proportion of iRGCs and consequently for the proper targeting of visual fibers at the dLGN. *Boc* acts as a high-affinity receptor for *Shh*, modulating its diffusion (Sánchez-Arrones et al., 2012). In other CNS regions, *Zic2* expression seems to depend upon *Shh* signaling (Brown et al., 2003; Hayhurst et al., 2008; Sanek et al., 2009), and *Zic2*, in turn, functions as a negative modulator of *Shh*-induced gene expression (Sanek et al., 2009). We thus postulated that, in the absence of *Boc*, which can increase cell sensitivity to *Shh* (Bergeron et al., 2011), the *Shh* pathway may be insufficiently activated in the VTC to sustain *Zic2* expression, the progressive loss of which would favor the generation of more late-born *Islet2*⁺ cRGCs. Consistent with this hypothesis, the observed decrease in *Zic2* immunostaining at E18 was preceded by a reduction of *Zic2* mRNA levels in the *Boc*^{−/−} VTC already at E16 (Fig. 4C,D,G,H). Conversely, expression of *Islet2* and *Shh* was expanded in the VTC of *Zic2*^{kd/kd} and *Foxd1*^{−/−} embryos (Fig. 8A–I).

The existence of a feedback regulatory loop between *Zic2* and *Shh* signaling, similar to that observed in forebrain patterning (Sanek et al., 2009), was further supported by the ectopic expression of *Shh* in the VTC of WT E13 embryos by means of *in utero* electroporation that led to the strong reduction of *Zic2* in transduced and adjacent cells analyzed 2 d later (Fig. 8J–K'). In addition, qPCR analysis of *Shh* and *Boc* mRNA levels 24 h after ectopic expression of *Zic2* in the central retina revealed a significant reduction of *Shh* expression and a concomitant significant increase in *Boc* expression (Fig. 8L), consistent with what observed in *Zic2*^{kd/kd} mice.

Discussion

The mouse retina comprises two distinct RGC populations, when considering their axon behavior at the chiasm. A small cohort of neurons generated in the VTC projects to the ipsilateral side of the brain directed by postmitotic *Zic2* expression (Herrera et al.,

retinas immunostained for *Zic2* or hybridized with specific probes for *Zic2* and *Sert* as indicated in the panels. The loss of *Zic2* immunostaining is preceded by a decrease in its mRNA expression (compare C and G with D and H). There is a progressive decrease and distal clustering of *Zic2*/*Sert*-positive and iRGCs in the *Boc*^{−/−} VTC. M, The graph represents the percentage of *Zic2*⁺ cells in the VTC of WT (dark gray line) and mutant (light gray line) animals at different stages. ***p* < 0.01 (Student's unpaired *t* test). cmz, Ciliary marginal zone; L, lens. Scale bar, 200 μm.

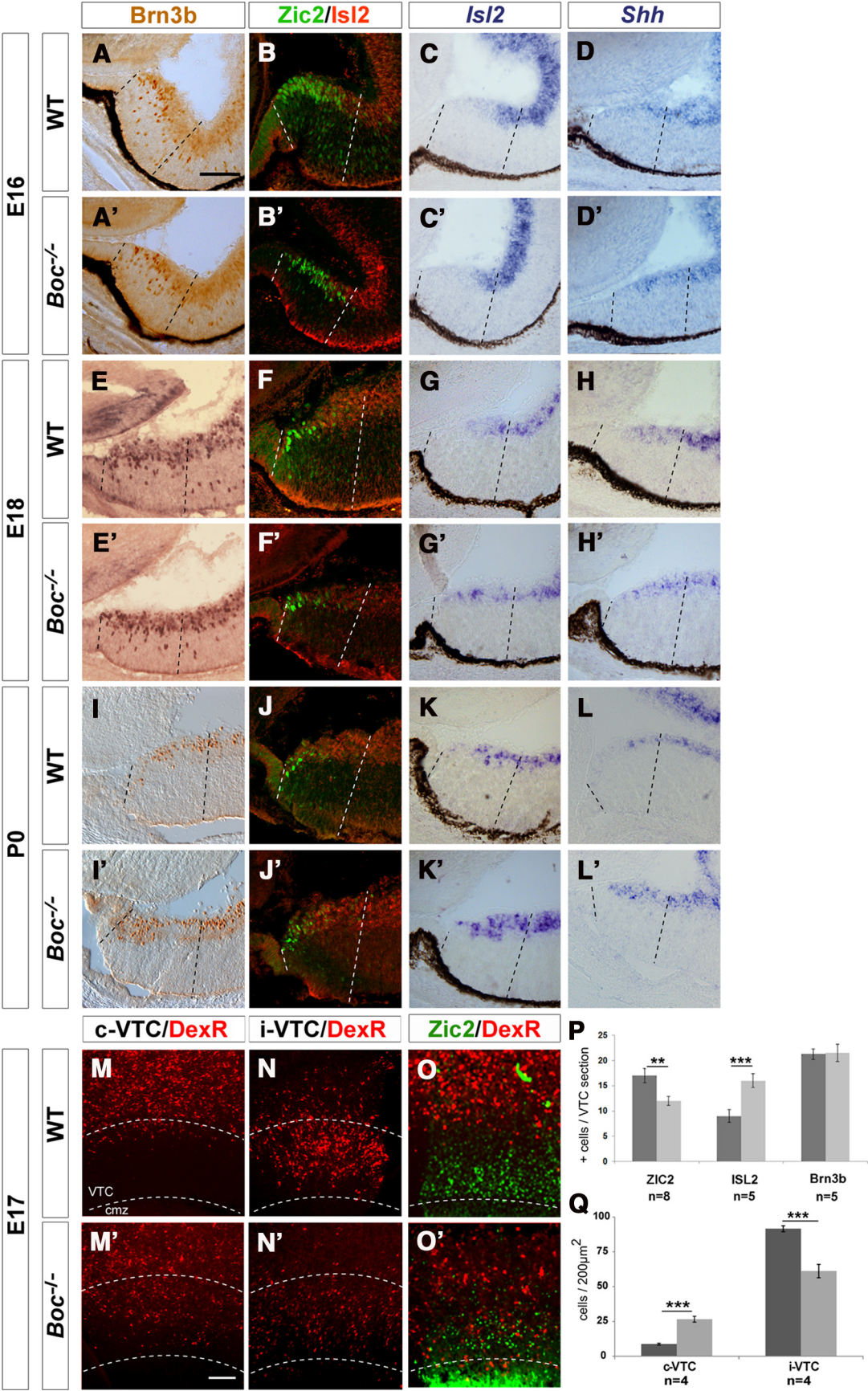


Figure 5. *A–L'*, Boc is required to restrain Islet2/Shh expression within the VTC. Frontal cryostat sections from E16 (*A–D'*), E18 (*E–H'*), and P0 (*I–L'*) WT and *Boc*^{−/−} central retinas immunostained for Brn3b, double-stained for Zic2 (green) and Islet2 (red), or hybridized with specific probes for *Islet2* and *Shh*, as indicated in the panels. The increase in Islet2⁺ cells parallels the decrease in Zic2⁺ cells in *Boc*^{−/−} tissue. There is a correspondent increase in *Islet2* and *Shh* expression in the mutants starting from E18. Dashed lines delimit the (Figure legend continues.)

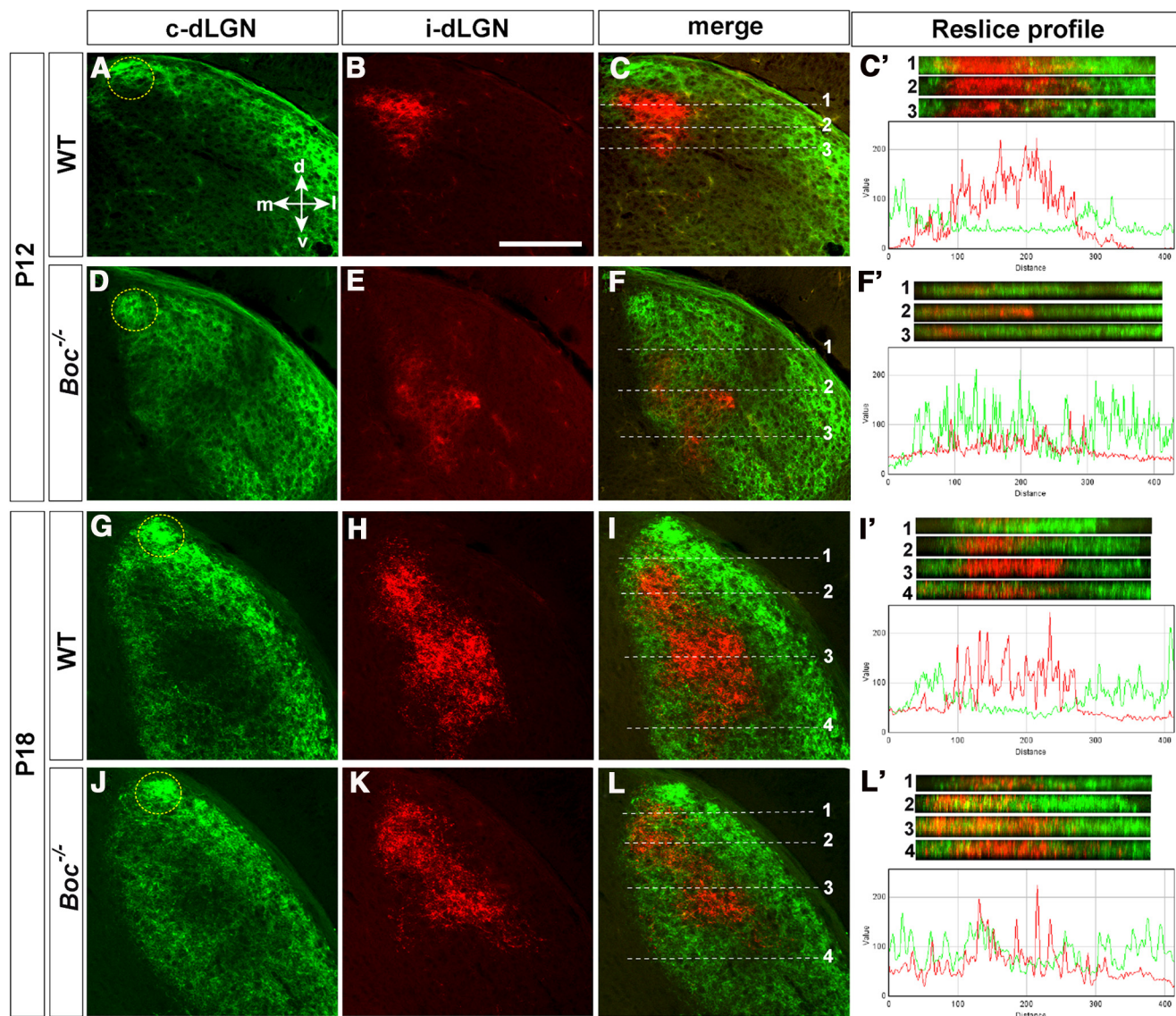


Figure 6. Organization of the retino-geniculate projections in postnatal *Boc*^{−/−} mice. Confocal analysis of frontal sections through the dLGN of P12 and P18 WT and *Boc*^{−/−} mice (as indicated in the panels) after whole-eye anterograde tracing with green and red fluorescent dyes. **C', F', I', L'**, Reslice profiles taken at the levels indicated in **C, F, I, and L**, respectively. The accompanying graphs represent the spectra of red (ipsilateral) and green (contralateral) channels of reslice 2 (**C', F'**) and reslice 3 (**I', L'**), respectively. In WT, the ipsilateral projection (red) is clustered in the dorsocentral dLGN surrounded by contralateral terminations (green). In *Boc*^{−/−}, ipsilateral fibers are reduced in this region. There is increased clustering of fiber in the dorsomedial tip (area circled with dotted lines) of dLGN where late-born cRGCs of the VTC project. d, Dorsal; m, medial; l, lateral; v, ventral. Scale bar: **A–L**, 250 μ m.

2003), whereas a large RGC population specified throughout the retina projects to the contralateral side of the brain. The amount of *Zic2*⁺ iRGCs generated in the VTC is strongly limited by the expression of *Islet2*, a transcription factor expressed by many cRGCs. Indeed, genetic inactivation of *Islet2* leads to an overproduction of *Zic2*⁺ neurons within the VTC, which fully behave as

ipsilateral projecting neurons (Pak et al., 2004). Our study now complements these observations and identifies a regulatory loop between *Zic2* and Boc-mediated Shh signaling as an important mechanism that limits the generation of *Islet2*⁺ cells in the VTC, thus maintaining the appropriate number of iRGCs in the mouse retina. Disruption of this regulatory loop shifts RGC production in the VTC toward a contralateral projecting fate, with consequent alterations in the retinotopic organization at the dLGN.

Our conclusions stem from the observation that in *Boc*^{−/−} mice the ipsilateral projection is reduced, without apparent loss of the overall number of RGCs in the VTC. Analysis of the retinotopic distribution in the *Boc*^{−/−} dLGN showed that part of the fibers originating from the ipsilateral eye target an area normally receiving contralateral projections, including those from late-born *Islet2*⁺ cells of the VTC. Consistent with this observation, *Zic2*⁺ cells in the *Boc*^{−/−} VTC, although present in normal numbers at embryonic stages, are diminished postnatally, whereas

(Figure legend continued.) VTC. **M–O'**, Low-power views of flat-mounted preparations of the ipsilateral and contralateral retinas from E17 embryos subjected to unilateral retrograde labeling from the optic tract, double-labeled with antibodies against *Zic2* (**O, O'**). In WT, the majority of backfilled neurons localized to the ipsilateral VTC (the VTC area is marked with dotted lines), whereas only few RGCs were found in the contralateral VTC. In *Boc*^{−/−} VTC, this proportion is shifted and there are numerous *Zic2*⁺ backfilled cells in the cVTC (**O'**). **P, Q**, The histograms represent the amount of *Zic2*⁺, *Islet2*⁺, or *Bm3b*⁺ cells in P0 (**P**) and the amount of backfilled cells present in the ipsilateral and contralateral retinas of E17 (**Q**), and WT (dark gray bars) and *Boc*^{−/−} (light gray bars) VTC. ***p* < 0.01 (Student's unpaired *t* test). ****p* < 0.001 (Student's unpaired *t* test). cmz, Ciliary marginal zone. Scale bar, 100 μ m.

Islet2⁺ cells are increased, indicating a shift in identity of part of the RGCs in the VTC.

A previous study explained the reduction of ipsilateral fibers in *Boc*^{−/−} embryos as a failure of axons to remain uncrossed, proposing that *Boc* normally mediates repulsive guidance information from midline-derived Shh. This hypothesis is based on tracing analysis at embryonic stages, turning assays in *Boc*-expressing RGCs and *Boc* overexpression studies similar to those presented here (Fabre et al., 2010). Our results now provide additional and complementary explanations for the ipsilateral visual fiber reduction in *Boc* mutants. Notably, however, our finding suggests that the influence of *Boc* on iRGC uncrossing behavior is not robust and likely needs to be fostered by other molecular determinants of chiasmatic fiber sorting (Petros et al., 2008). Although we observed a modest increase in the total number of axons that aberrantly project ipsilaterally upon *Boc* overexpression as shown in (Fabre et al., 2010), this change in axonal laterality is not substantial when analyzed in the context of the total number of cells that overexpress *Boc* or compared with the effect of gain-of-*Zic2* function. Furthermore, in *Boc* mutants, postnatal retinotopic organization at the dLGN is different from that reported for other mouse mutants with reduced ipsilateral projections and increased fiber decussation, such as the *EphB1*^{−/−} and *Tyr^{c-2J/c-2J}* (albino) mice, in which the cohort of misprojecting fibers terminates in a patch well segregated from the surrounding projections (Rebsam et al., 2009; Rebsam et al., 2012). In the *EphB1*^{−/−} mutants, the patch localizes within the ipsilateral domain, whereas in albinos it lies close to the region where late-born VTC neurons project. These differences have been interpreted as a differential retention of ipsilateral identity in misrouted neurons (Rebsam et al., 2012). Indeed, in *EphB1*^{−/−} mutants, *Zic2* is still expressed in misprojecting neurons (E.H., unpublished observations), consistent with the reported regulation of *EphB1* by *Zic2* (Garcia-Frigola et al., 2008; Lee et al., 2008). In albino mice instead, there are less *Zic2*⁺ cells in the VTC, although there is no parallel increase in the expression of crossed projections markers, suggesting abnormal specification (Rebsam et al., 2012). In *Boc*^{−/−} mice, misrouted fibers from the ipsilateral eye invade the field destined to contralateral projections, especially the zone of late-born VTC neurons as in albinos. There is, however, a fundamental difference: misrouted fibers intermingled with the surrounding projections, reflecting that a proportion of VTC neurons shifted to full contralateral identity, as also supported by the increased in retrograde-labeled and *Islet2/Shh*⁺ cells. Consistent with abnormal sorting at the chiasm (Fabre et al., 2010), sparse

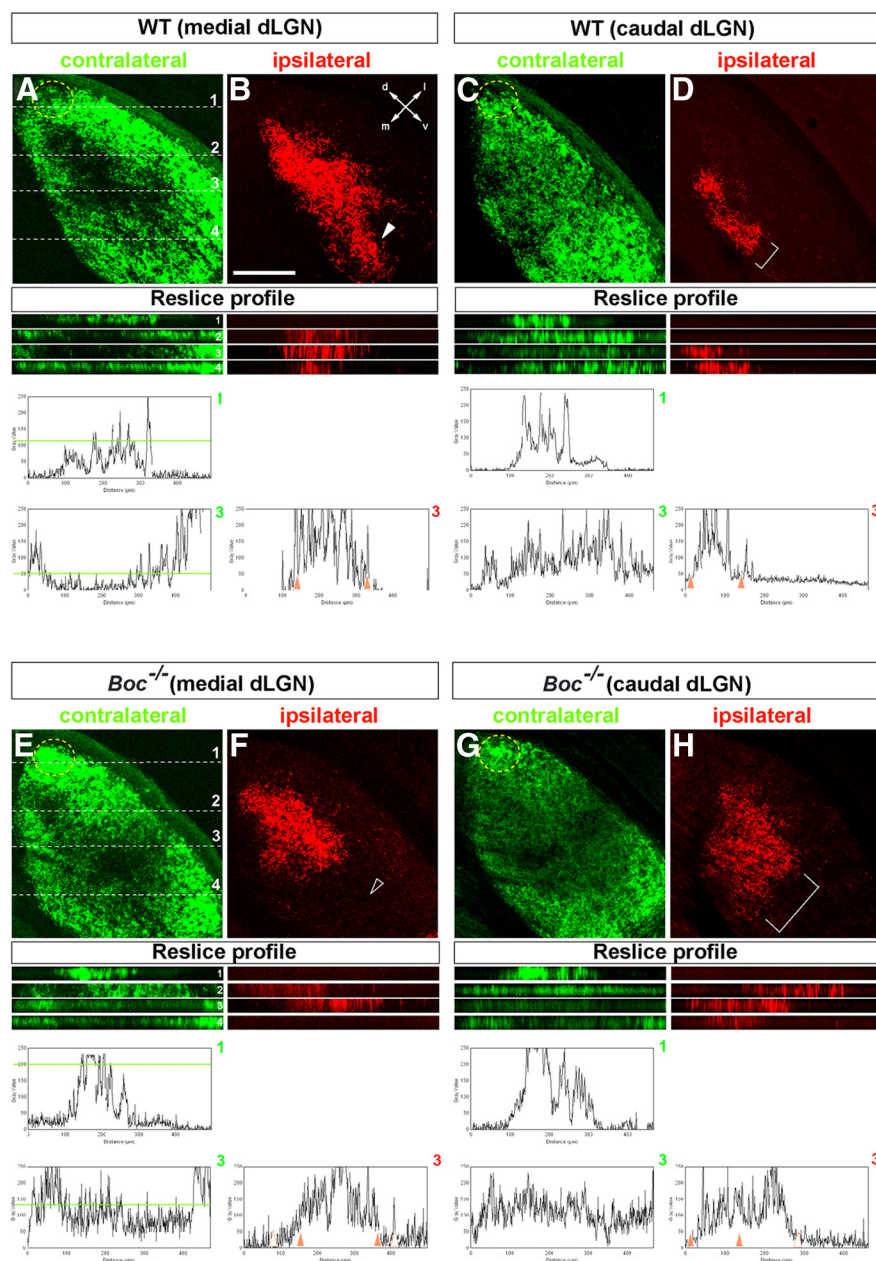


Figure 7. Organization of the retino-geniculate projections in adult *Boc*^{−/−} mice. The images show confocal analysis of frontal sections through different axial levels of the dLGN of P30 WT and *Boc*^{−/−} mice after whole-eye anterograde tracing with green and red fluorescent dyes. Reslice profiles represented below each image are taken at the levels indicated in **A** for **A–D**, and in **E** for **E–H**. The accompanying graphs represent the spectra of red (ipsilateral) and green (contralateral) channels of the reslices as indicated in the figure. d, Dorsal; m, medial; l, lateral; v, ventral. Scale bar, 250 μ m.

terminations from the contralateral eye localized to the *Boc*^{−/−} dorsomedial ipsilateral field, particularly in the caudal dLGN. These mistargeted fibers may alternatively represent axons that have missed midline guidance information because they grow at lower pace, as suggested by the abnormal growth cone accumulation in the chiasm and ipsilateral tract and the particularly reduced innervation of the mutant dLGN at early stages. As an additional possibility, they could represent contralateral sprouts on unoccupied dorsocentral dLGN neurons.

Searching for the relationship between *Boc* and *Zic2*, we showed that in, *Zic2*^{−/−} and *FoxD1*^{−/−} embryos, *Islet2* and *Shh* expression is increased, whereas *Boc* mRNA is decreased or absent. This supports the proposed existence of a cross-regulatory

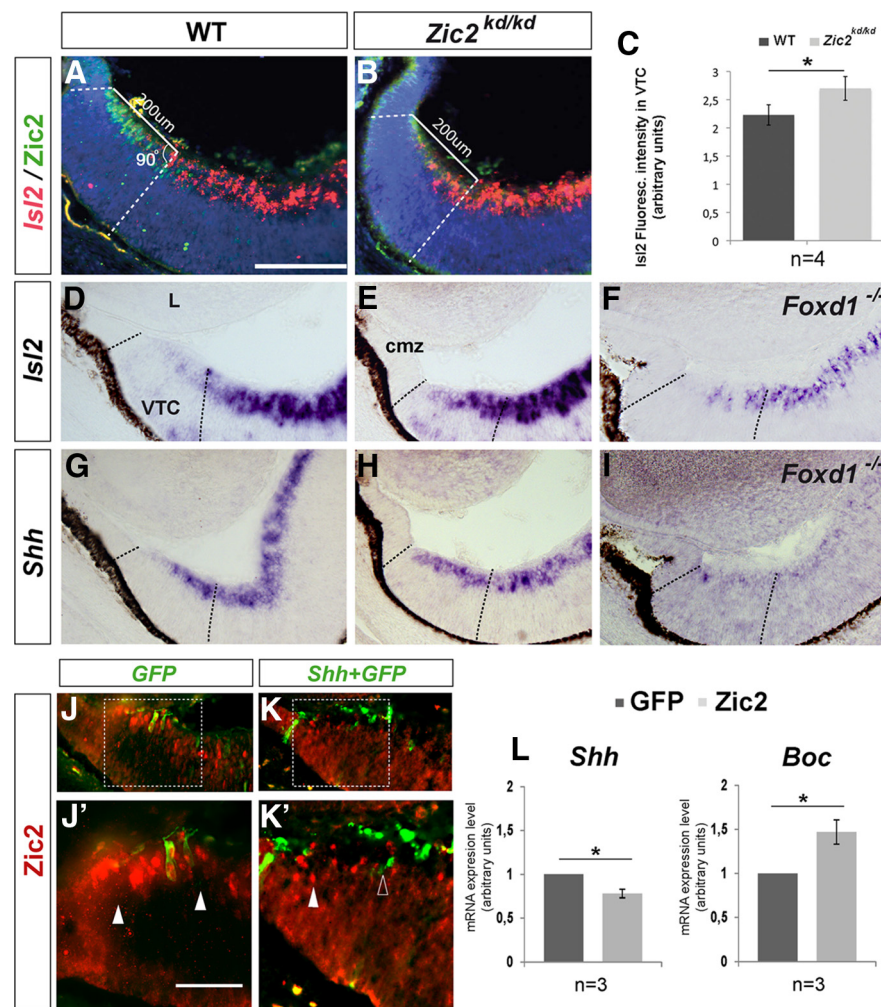


Figure 8. A feedback regulatory loop between Zic2 and Shh signaling in the VTC. **A, B, D, E–I**, Frontal cryostat sections from E16 WT (**A, D, G**), *Zic2*^{kd/kd} (**B, E, H**), and *Foxd1*^{−/−} (**F, I**) central retinal sections hybridized with probes for *Islet2* (**A, B, D–F**) and *Shh* (**G–I**) and immunostained with antibodies against Zic2 (**A, B**). WT embryos are *Zic2*^{kd/kd} littermates. Littermates from *Foxd1*^{−/−} line are not shown as they were no different from those shown in **D** and **G**. **C**, The histogram represents the increment of *Islet2*⁺ fluorescence in the *Zic2*^{kd/kd} VTC compared with WT. **p* < 0.05 (Student's unpaired *t* test). **J–K'**, Control GFP (**J, J'**) or *Shh::GFP* (**K, K'**) electroporated VTC from E15 WT embryos immunostained with antibodies against Zic2 (red). There is an absence of Zic2 staining in the region where *Shh* is ectopically expressed, whereas Zic2 staining is still present in GFP-positive controls (solid and empty arrowheads in **J'–K'** point to Zic2⁺ and [−] regions, respectively). **L**, qPCR analysis of the levels of *Shh* and *Boc* expression after *ex utero* electroporation of *Zic2* in the central retina of E13 WT embryos. Tissue was collected and analyzed 24 h later. Analysis was performed on pools of eight different retinas for each sample, and experiments were repeated three times. Data were analyzed with the Mann–Whitney test: **p* < 0.05. cmz, Ciliary marginal zone; L, lens. Scale bars: **A–I**, 200 μ m; **J–K'**, 100 μ m.

repression between Zic2 and Islet2 in the VTC (Pak et al., 2004) and indicates that *Boc* acts downstream of Zic2. Zic2, a member of the Gli family of zinc-finger transcription factors, shares with Gli similar consensus binding sites on the DNA (Aruga, 2004), which, notably, are repetitively present in highly conserved non-coding regions of the *Boc* locus in different mammalian species (unpublished observations), suggesting a possible direct regulation. Furthermore, *Boc*, although important for mutual regulation between iRGC and cRGC in the VTC, is not essential for the onset of Zic2 expression, as this is normally initiated in *Boc* mutants but subsequently retained only in a subset of neurons. This normal initiation might be in apparent contradiction with the decreased ipsilateral projection already observed at E16. However, in the absence of *Boc*, initial Zic2 expression might reach levels insufficient to trigger a full ipsilateral behavior and support fiber extension at a normal speed, as suggested by the increased

number of growth cones in the chiasm and optic tract. Although we have found no differences in proliferation or apoptosis between WT and mutant retina, we cannot completely exclude that this slower growth may interfere with axon targeting, which would finally lead to cell death, contributing to the decrease of the iRGCs population.

Studies in mouse and zebrafish have proposed that activation and likely maintenance of Zic2 expression in the forebrain depend, directly or indirectly, on Shh signaling (Brown et al., 2003; Hayhurst et al., 2008; Sanek et al., 2009). Zic2, however, predominantly localizes to the dorsal CNS, where Gli repressor forms are mostly found (Stecca and Ruiz i Altaba, 2010), suggesting that Zic2 expression requires only low Shh signaling. Taking this information together with our result, we propose a model (Fig. 9) in which low levels of Shh, diffusing from the differentiating cRGC, contributes to activate Zic2 with an opposite gradient, so that high levels of Zic2 will be always found in the distal-most retina close to the CMZ, as previously described in WT embryos at the onset of iRGC generation (Herrera et al., 2003; Tian et al., 2008). Once activated, Zic2 would then regulate *Boc* expression in the RGC and modulate cell-autonomously the responsiveness to Shh signaling, similarly to the feedback circuit between the Shh pathway and homeodomain transcription factors proposed to control patterning output in the neural tube (Lek et al., 2010). *Boc*, *Cdon*, and their *Drosophila* counterparts have been shown to alter the levels of diffusible hh ligands (Hartman et al., 2010). Thus, in the absence of *Boc*, Shh might diffuse a larger distance extending its gradient within the VTC (Fig. 9). As a consequence, RGCs would receive higher Shh levels, which may in turn interfere with sustained Zic2 expression. This would explain why in

Boc^{−/−} mice residual Zic2⁺ cells are clustered close to the CMZ. In this distal region, Shh levels would be sufficiently low to sustain Zic2 levels, which would then activate *EphB1* and *Sert* expression, enabling the formation of a partial ipsilateral projection. Cross-regulation between Zic2 and Shh signaling through *Boc* might also explain why *Boc* overexpression diminishes Zic2-induced uncrossed behavior in cRGC. Indeed, *Boc* presence in the Shh-expressing cRGCs may trap the morphogen, increasing the levels of the signaling effector Gli1, which could compete with Zic2 for DNA binding sites, finally reducing Zic2 activity.

Differential spatiotemporal expression of Shh target genes is highly dependent on both the levels and duration of cell exposure to Shh (Dessaud et al., 2007; Balaskas et al., 2012). The floor plate cells that, as cRGCs, secrete and respond to Shh, are patterned by high and transient Shh signaling (Ribes et al., 2010). In *Boc* absence, increased Shh diffusion in the VTC might shift cells toward

the cRGC program, including the onset of *Isl2* and *Shh* expression itself, which is known to regulate cRGC specification and differentiation (Esteve and Bovolenta, 2006). In a feedback loop, Shh will further repress *Zic2* expression as observed upon ectopic expression of *Shh* in the VTC and previously reported for other *Zic* transcription factors in zebrafish and chick embryos (Rohr et al., 1999; Aruga et al., 2002).

Recent studies have shown that Boc, Cdon, and Gas1 can substitute one another in specific contexts as demonstrated by triple genetic inactivation in mice (Allen et al., 2011; Bae et al., 2011). The colocalization of the three receptors in the CMZ, but not in the VTC, could explain why *Zic2* expression is maintained in the CMZ but is selectively downregulated in the *Boc*^{−/−} VTC. The presence of other factors may instead explain why iRGC loss in *Boc*^{−/−} mutants is partial. *Lrp2*, a member of the low-density lipoprotein receptor family (McCarthy et al., 2002) that binds and accumulates Shh (Christ et al., 2012) is a possible example.

In conclusion, we propose that appropriate levels of Boc-mediated Shh signaling cooperate with *Zic2* toward mouse iRGC specification and connectivity. In all vertebrates, committed cRGC precursors secrete Shh (Traiffort et al., 2001; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008), which influences retina neurogenesis, likely in a species-specific manner (Esteve and Bovolenta, 2006). In mice, ablation of retinal *Shh* or of its essential signaling component *Smoothed* leads to an increase in RGC number, suggesting that Shh signaling limits the production of cRGCs (Wang et al., 2005; Sakagami et al., 2009). Therefore, different levels of Shh signaling activation, likely mediated by different receptors, together with mutual repression between *Zic2* and *Isl2*, might be at the basis of iRGC and cRGC divergence (Fig. 9) and the consequent establishment of appropriate eye specific inputs to primary targets.

References

- Allen BL, Song JY, Izzi L, Althaus IW, Kang JS, Charron F, Krauss RS, McMahon AP (2011) Overlapping roles and collective requirement for the coreceptors GAS1, CDO, and BOC in SHH pathway function. *Dev Cell* 20:775–787. [CrossRef Medline](#)
- Aruga J (2004) The role of *Zic* genes in neural development. *Mol Cell Neurosci* 26:205–221. [CrossRef Medline](#)
- Aruga J, Tohmonda T, Homma S, Mikoshiba K (2002) *Zic1* promotes the expansion of dorsal neural progenitors in spinal cord by inhibiting neuronal differentiation. *Dev Biol* 244:329–341. [CrossRef Medline](#)
- Bae GU, Doménec S, Roessler E, Schachter K, Kang JS, Muenke M, Krauss RS (2011) Mutations in *CDON*, encoding a hedgehog receptor, result in holoprosencephaly and defective interactions with other hedgehog receptors. *Am J Hum Genet* 89:231–240. [CrossRef Medline](#)
- Balaskas N, Ribeiro A, Panovska J, Dessaud E, Sasai N, Page KM, Briscoe J, Ribes V (2012) Gene regulatory logic for reading the Sonic Hedgehog

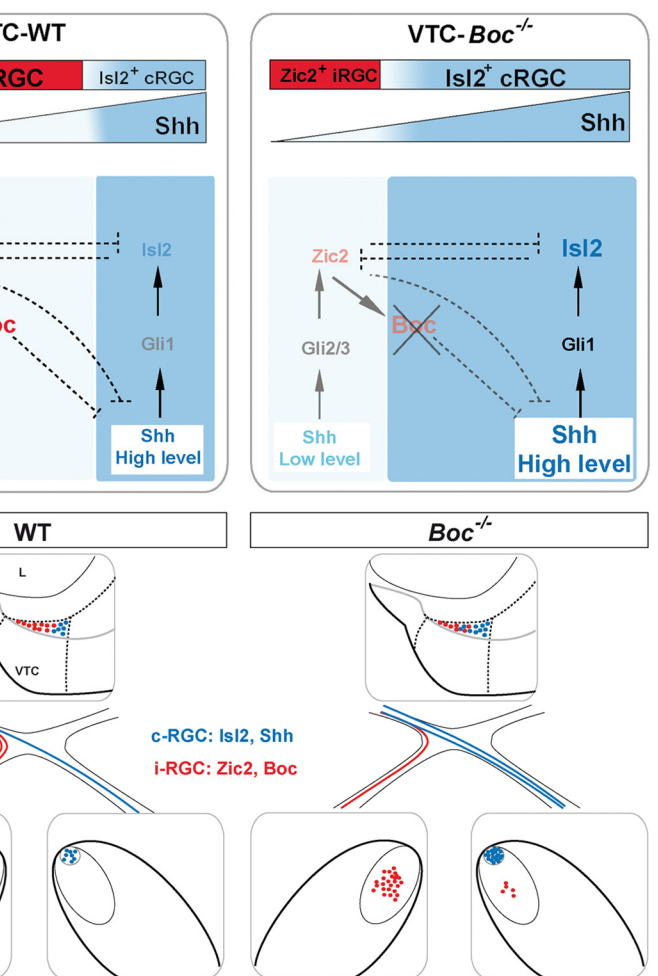


Figure 9. Summary diagram of the proposed mechanism for iRGC and cRGC specification in the VTC and its consequent retinotopic organization based on the analysis of *Boc*-null mice. **A**, A feedback regulatory loop between Boc-mediated Shh signaling and *Zic2* activated by low Shh concentration drives iRGC generation in WT animals. In the absence of *Boc*, the VTC receives higher Shh levels from the adjacent cRGC precluding *Zic2* expression and thus shifting RGC toward a contralateral identity (see Discussion). **B**, Shift of RGC identity coupled to occasional pathfinding defects causes changes in the organization of retinal projections at the dLGN. cmz, Giliary marginal zone; L, lens.

signaling gradient in the vertebrate neural tube. *Cell* 148:273–284. [CrossRef Medline](#)

- Beccari L, Conte I, Cisneros E, Bovolenta P (2012) Sox2-mediated differential activation of *Six3.2* contributes to forebrain patterning. *Development* 139:151–164. [CrossRef Medline](#)
- Bergeron SA, Tyurina OV, Miller E, Bagas A, Karlstrom RO (2011) Brother of cdo (umleitung) is cell-autonomously required for Hedgehog-mediated ventral CNS patterning in the zebrafish. *Development* 138:75–85. [CrossRef Medline](#)
- Brown LY, Kottmann AH, Brown S (2003) Immunolocalization of *Zic2* expression in the developing mouse forebrain. *Gene Expr Patterns* 3:361–367. [CrossRef Medline](#)
- Carreres MI, Escalante A, Murillo B, Chauvin G, Gaspar P, Vegar C, Herrera E (2011) Transcription factor *Foxd1* is required for the specification of the temporal retina in mammals. *J Neurosci* 31:5673–5681. [CrossRef Medline](#)
- Christ A, Christa A, Kur E, Lioubinski O, Bachmann S, Willnow TE, Hammes A (2012) LRP2 is an auxiliary SHH receptor required to condition the forebrain ventral midline for inductive signals. *Dev Cell* 22:268–278. [CrossRef Medline](#)
- Connor RM, Allen CL, Devine CA, Claxton C, Key B (2005) BOC, brother of CDO, is a dorsoventral axon-guidance molecule in the embryonic vertebrate brain. *J Comp Neurol* 485:32–42. [CrossRef Medline](#)
- Dessaud E, Yang LL, Hill K, Cox B, Ulloa F, Ribeiro A, Mynett A, Novitsch BG, Briscoe J (2007) Interpretation of the sonic hedgehog morphogen gradient

- by a temporal adaptation mechanism. *Nature* 450:717–720. [CrossRef Medline](#)
- Dräger UC (1985) Birth dates of retinal ganglion cells giving rise to the crossed and uncrossed optic projections in the mouse. *Proc R Soc Lond* 224:57–77. [CrossRef Medline](#)
- Dräger UC, Olsen JF (1980) Origins of crossed and uncrossed retinal projections in pigmented and albino mice. *J Comp Neurol* 191:383–412. [CrossRef Medline](#)
- Erkman L, Yates PA, McLaughlin T, McEvilly RJ, Whisenhunt T, O'Connell SM, Krones AI, Kirby MA, Rapaport DH, Birmingham JR, O'Leary DD, Rosenfeld MG (2000) A POU domain transcription factor-dependent program regulates axon pathfinding in the vertebrate visual system. *Neuron* 28:779–792. [CrossRef Medline](#)
- Erskine L, Herrera E (2007) The retinal ganglion cell axon's journey: insights into molecular mechanisms of axon guidance. *Dev Biol* 308:1–14. [CrossRef Medline](#)
- Erskine L, Reijntjes S, Pratt T, Denti L, Schwarz Q, Vieira JM, Alakakone B, Shewan D, Ruhrberg C (2011) VEGF signaling through neuropilin 1 guides commissural axon crossing at the optic chiasm. *Neuron* 70:951–965. [CrossRef Medline](#)
- Esteve P, Bovolenta P (2006) Secreted inducers in vertebrate eye development: more functions for old morphogens. *Curr Opin Neurobiol* 16:13–19. [CrossRef Medline](#)
- Esteve P, Trousse F, Rodríguez J, Bovolenta P (2003) SFRP1 modulates retinal cell differentiation through a β -catenin-independent mechanism. *J Cell Sci* 116:2471–2481. [CrossRef Medline](#)
- Fabre PJ, Shimogori T, Charron F (2010) Segregation of ipsilateral retinal ganglion cell axons at the optic chiasm requires the Shh receptor Boc. *J Neurosci* 30:266–275. [CrossRef Medline](#)
- García-Frigola C, Herrera E (2010) Zic2 regulates the expression of Sert to modulate eye-specific refinement at the visual targets. *EMBO J* 29:3170–3183. [CrossRef Medline](#)
- García-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Herrera E (2007) Gene delivery into mouse retinal ganglion cells by in utero electroporation. *BMC Dev Biol* 7:103. [CrossRef Medline](#)
- García-Frigola C, Carreres MI, Vegar C, Mason C, Herrera E (2008) Zic2 promotes axonal divergence at the optic chiasm midline by EphB1-dependent and -independent mechanisms. *Development* 135:1833–1841. [CrossRef Medline](#)
- Godement P, Vanselow J, Thanos S, Bonhoeffer F (1987) A study in developing visual systems with a new method of staining neurones and their processes in fixed tissue. *Development* 101:697–713. [Medline](#)
- Hartman TR, Zinshteyn D, Schofield HK, Nicolas E, Okada A, O'Reilly AM (2010) Drosophila Boi limits Hedgehog levels to suppress follicle stem cell proliferation. *J Cell Biol* 191:943–952. [CrossRef Medline](#)
- Hatini V, Huh SO, Herzlinger D, Soares VC, Lai E (1996) Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2. *Genes Dev* 10:1467–1478. [CrossRef Medline](#)
- Hayhurst M, Gore BB, Tessier-Lavigne M, McConnell SK (2008) Ongoing sonic hedgehog signaling is required for dorsal midline formation in the developing forebrain. *Dev Neurobiol* 68:83–100. [CrossRef Medline](#)
- Herrera E, Brown L, Aruga J, Rachel RA, Dolen G, Mikoshiba K, Brown S, Mason CA (2003) Zic2 patterns binocular vision by specifying the uncrossed retinal projection. *Cell* 114:545–557. [CrossRef Medline](#)
- Herrera E, Marcus R, Li S, Williams SE, Erskine L, Lai E, Mason C (2004) Foxd1 is required for proper formation of the optic chiasm. *Development* 131:5727–5739. [CrossRef Medline](#)
- Jaubert-Miazza L, Green E, Lo FS, Bui K, Mills J, Guido W (2005) Structural and functional composition of the developing retinogeniculate pathway in the mouse. *Vis Neurosci* 22:661–676. [CrossRef Medline](#)
- Lee CS, May NR, Fan CM (2001) Transdifferentiation of the ventral retinal pigmented epithelium to neural retina in the growth arrest specific gene 1 mutant. *Dev Biol* 236:17–29. [CrossRef Medline](#)
- Lee R, Petros TJ, Mason CA (2008) Zic2 regulates retinal ganglion cell axon avoidance of ephrinB2 through inducing expression of the guidance receptor EphB1. *J Neurosci* 28:5910–5919. [CrossRef Medline](#)
- Lek M, Dias JM, Marklund U, Uhde CW, Kurdija S, Lei Q, Sussel L, Rubenstein JL, Matise MP, Arnold HH, Jessell TM, Ericson J (2010) A homeodomain feedback circuit underlies step-function interpretation of a Shh morphogen gradient during ventral neural patterning. *Development* 137:4051–4060. [CrossRef Medline](#)
- McCarthy RA, Barth JL, Chintalapudi MR, Knaak C, Argraves WS (2002) Megalin functions as an endocytic sonic hedgehog receptor. *J Biol Chem* 277:25660–25667. [CrossRef Medline](#)
- Mu X, Klein WH (2004) A gene regulatory hierarchy for retinal ganglion cell specification and differentiation. *Semin Cell Dev Biol* 15:115–123. [CrossRef Medline](#)
- Mu X, Beremand PD, Zhao S, Pershad R, Sun H, Scarpa A, Liang S, Thomas TL, Klein WH (2004) Discrete gene sets depend on POU domain transcription factor Brn3b/Brn-3.2/POU4f2 for their expression in the mouse embryonic retina. *Development* 131:1197–1210. [CrossRef Medline](#)
- Nagai T, Aruga J, Minowa O, Sugimoto T, Ohno Y, Noda T, Mikoshiba K (2000) Zic2 regulates the kinetics of neurulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:1618–1623. [CrossRef Medline](#)
- Okada A, Charron F, Morin S, Shin DS, Wong K, Fabre PJ, Tessier-Lavigne M, McConnell SK (2006) Boc is a receptor for sonic hedgehog in the guidance of commissural axons. *Nature* 444:369–373. [CrossRef Medline](#)
- Pak W, Hindges R, Lim YS, Pfaff SL, O'Leary DD (2004) Magnitude of binocular vision controlled by islet-2 repression of a genetic program that specifies laterality of retinal axon pathfinding. *Cell* 119:567–578. [CrossRef Medline](#)
- Petros TJ, Rebsam A, Mason CA (2008) Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci* 31:295–315. [CrossRef Medline](#)
- Petros TJ, Shrestha BR, Mason C (2009) Specificity and sufficiency of EphB1 in driving the ipsilateral retinal projection. *J Neurosci* 29:3463–3474. [CrossRef Medline](#)
- Quina LA, Pak W, Lanier J, Banwait P, Gratwick K, Liu Y, Velasquez T, O'Leary DD, Goulding M, Turner EE (2005) Brn3a-expressing retinal ganglion cells project specifically to thalamocortical and collicular visual pathways. *J Neurosci* 25:11595–11604. [CrossRef Medline](#)
- Rebsam A, Petros TJ, Mason CA (2009) Switching retinogeniculate axon laterality leads to normal targeting but abnormal eye-specific segregation that is activity dependent. *J Neurosci* 29:14855–14863. [CrossRef Medline](#)
- Rebsam A, Bhansali P, Mason CA (2012) Eye-specific projections of retinogeniculate axons are altered in albino mice. *J Neurosci* 32:4821–4826. [CrossRef Medline](#)
- Ribes V, Balaskas N, Sasai N, Cruz C, Dessaud E, Cayuso J, Tozer S, Yang LL, Novitsch B, Marti E, Briscoe J (2010) Distinct Sonic Hedgehog signaling dynamics specify floor plate and ventral neuronal progenitors in the vertebrate neural tube. *Genes Dev* 24:1186–1200. [CrossRef Medline](#)
- Rohr KB, Schulte-Merker S, Tautz D (1999) Zebrafish zic1 expression in brain and somites is affected by BMP and hedgehog signalling. *Mech Dev* 85:147–159. [CrossRef Medline](#)
- Sakagami K, Gan L, Yang XJ (2009) Distinct effects of Hedgehog signaling on neuronal fate specification and cell cycle progression in the embryonic mouse retina. *J Neurosci* 29:6932–6944. [CrossRef Medline](#)
- Sánchez-Arrones L, Cardozo M, Nieto-Lopez F, Bovolenta P (2012) Cdon and Boc: two transmembrane proteins implicated in cell–cell communication. *Int J Biochem Cell Biol* 44:698–702. [CrossRef Medline](#)
- Sánchez-Camacho C, Bovolenta P (2008) Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135:3531–3541. [CrossRef Medline](#)
- Sánchez-Camacho C, Bovolenta P (2009) Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *BioEssays* 31:1013–1025. [CrossRef Medline](#)
- Sanek NA, Taylor AA, Nyholm MK, Grinblat Y (2009) Zebrafish zic2a patterns the forebrain through modulation of Hedgehog-activated gene expression. *Development* 136:3791–3800. [CrossRef Medline](#)
- Stecca B, Ruiz i Altaba A (2010) Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by hedgehog and non-hedgehog signals. *J Mol Cell Biol* 2:84–95. [CrossRef Medline](#)
- Tenzen T, Allen BL, Cole F, Kang JS, Krauss RS, McMahon AP (2006) The cell surface membrane proteins Cdo and Boc are components and targets of the Hedgehog signaling pathway and feedback network in mice. *Dev Cell* 10:647–656. [CrossRef Medline](#)
- Tian NM, Pratt T, Price DJ (2008) Foxg1 regulates retinal axon pathfinding by repressing an ipsilateral program in nasal retina and by causing optic chiasm cells to exert a net axonal growth-promoting activity. *Development* 135:4081–4089. [CrossRef Medline](#)
- Traiffort E, Moya KL, Faure H, Hässig R, Ruat M (2001) High expression

- and anterograde axonal transport of aminoterminal sonic hedgehog in the adult hamster brain. *Eur J Neurosci* 14:839–850. [CrossRef Medline](#)
- Trousse F, Martí E, Gruss P, Torres M, Bovolenta P (2001) Control of retinal ganglion cell axon growth: a new role for Sonic hedgehog. *Development* 128:3927–3936. [Medline](#)
- Wang SW, Mu X, Bowers WJ, Kim DS, Plas DJ, Crair MC, Federoff HJ, Gan L, Klein WH (2002) Brn3b/Brn3c double knockout mice reveal an unsuspected role for Brn3c in retinal ganglion cell axon outgrowth. *Development* 129:467–477. [Medline](#)
- Wang Y, Dakubo GD, Thuring S, Mazerolle CJ, Wallace VA (2005) Retinal ganglion cell-derived sonic hedgehog locally controls proliferation and the timing of RGC development in the embryonic mouse retina. *Development* 132:5103–5113. [CrossRef Medline](#)
- Williams SE, Mann F, Erskine L, Sakurai T, Wei S, Rossi DJ, Gale NW, Holt CE, Mason CA, Henkemeyer M (2003) Ephrin-B2 and EphB1 mediate retinal axon divergence at the optic chiasm. *Neuron* 39: 919–935. [CrossRef Medline](#)

Secreted Frizzled Related Proteins Modulate Pathfinding and Fasciculation of Mouse Retina Ganglion Cell Axons by Direct and Indirect Mechanisms

Séverine Marcos,^{1,2,3} Francisco Nieto-Lopez,^{1,2,3} Africa Sandonís,^{1,2,3} Marcos Julian Cardozo,^{1,2,3} Fabiana Di Marco,¹ Pilar Esteve,^{1,2,3} and Paola Bovolenta^{1,2,3}

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid, Madrid 28049, Spain,

²Centro de Investigación Biom  dica en Red de Enfermedades Raras, Madrid 28049, Spain, and ³Instituto Cajal, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28002 Madrid, Spain

Retina ganglion cell (RGC) axons grow along a stereotyped pathway undergoing coordinated rounds of fasciculation and defasciculation, which are critical to establishing proper eye–brain connections. How this coordination is achieved is poorly understood, but shedding of guidance cues by metalloproteinases is emerging as a relevant mechanism. Secreted Frizzled Related Proteins (Sfrps) are multifunctional proteins, which, among others, reorient RGC growth cones by regulating intracellular second messengers, and interact with Tolloid and ADAM metalloproteinases, thereby repressing their activity. Here, we show that the combination of these two functions well explain the axon guidance phenotype observed in *Sfrp1* and *Sfrp2* single and compound mouse mutant embryos, in which RGC axons make subtle but significant mistakes during their intraretinal growth and inappropriately defasciculate along their pathway. The distribution of *Sfrp1* and *Sfrp2* in the eye is consistent with the idea that Sfrp1/2 normally constrain axon growth into the fiber layer and the optic disc. Disheveled axon growth instead seems linked to Sfrp-mediated modulation of metalloproteinase activity. Indeed, retinal explants from embryos with different *Sfrp*-null alleles or explants overexpressing ADAM10 extend axons with a disheveled appearance, which is reverted by the addition of Sfrp1 or an ADAM10-specific inhibitor. This mode of growth is associated with an abnormal proteolytic processing of L1 and N-cadherin, two ADAM10 substrates previously implicated in axon guidance. We thus propose that Sfrps contribute to coordinate visual axon growth with a dual mechanism: by directly signaling at the growth cone and by regulating the processing of other relevant cues.

Key words: axon guidance; metalloproteinase; optic chiasm; optic disc; Sfrp; visual pathway

Introduction

In vertebrates, retina ganglion cell (RGC) axons convey visual information from the eye to the brain through a long pathway that is stereotypically composed of different segments. The fiber layer and the optic nerve and tract are segments in which axons grow tightly fasciculated to their neighbors. Axon initiation, navigation through the optic disc (OD) and chiasm, or the selection of the target neuron within the lateral geniculate nucleus or superior colliculus represent instead “decision” steps in which axons can take different routes, diverging if necessary from the

behavior of their neighbors. Linear segments and choice points alternate along the pathway (Bovolenta and Mason, 1987). Therefore, coordination among extrinsic cues that mediates selective axon fasciculation/defasciculation and those that provide steering information to growth cones is critical for proper development of the visual system.

Functional studies in vertebrates have shown that members of evolutionary conserved families of attractive and repulsive guidance cues, such as Slits, Semaphorins, or Ephrins, and morphogenetic signaling pathways activated by Shh or Wnts are among the extrinsic cues that direct RGC growth cones navigation at choice points (Bao, 2008; Petros et al., 2008; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2009; Erskine and Herrera, 2014). Cell adhesion molecules, integrins, or cadherins instead mostly mediate RGC axon fasciculation (Bao, 2008).

What coordinates the activity of these extrinsic cues is still poorly understood, although members of the matrix metalloproteinase and A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) families are emerging as attractive candidates (McFarlane, 2003; Bai and Pfaff, 2011). Indeed, ADAM10 or its *Drosophila* homolog *kuzbanian* terminates high-affinity interaction between Ephrins and their Eph receptors (Hattori et al., 2000) and cleaves the extracellular domain of Robo (Coleman et al., 2010) and Neuro-

Received Aug. 2, 2013; revised Jan. 30, 2015; accepted Feb. 10, 2015.

Author contributions: S.M., M.J.C., P.E., and P.B. designed research; S.M., A.S., F.N.-L., M.J.C., F.D.M., and P.E. performed research; S.M., F.N.-L., F.D.M., P.E., and P.B. analyzed data; S.M. and P.B. wrote the paper.

This work was supported by the Spanish MINECO (Grants BFU2010-16031 and BFU2013-43213-P), Comunidad Autónoma de Madrid (Grant S2010/BMD-2315) Cost Action BM1001 Brain ECM in Health and Disease, an institutional grant from the Fundación Ramón Areces and Centro de Investigación Biom  dica en Red de Enfermedades Raras (P.B.). F.N.-L. and M.J.C. were supported by a FPU and FPI fellowship from the Spanish Government, respectively. We thank F. Murakami, L. Erskine, A. Chedotal, A. Ludwig, and V.P. Lemmon for reagents.

The authors declare no competing financial interests.

Correspondence should be addressed to Paola Bovolenta, Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas–Universidad Autónoma de Madrid, c/Nicolas Cabrera 2, Madrid 28049, Spain. E-mail: pbovolenta@cbm.csic.es.

DOI:10.1523/JNEUROSCI.3304-13.2015

Copyright    2015 the authors 0270-6474/15/354729-12\$15.00/0

pilin1 receptors (Romi et al., 2014), thereby changing the sensitivity of growth cones to Slit and Sema3A ligands, respectively. Furthermore, ADAM10 sheds the extracellular domain of N-cadherin and L1 (Reiss et al., 2005; Riedle et al., 2009; Malinverno et al., 2010), which both participate in selective fasciculation of visual axons (Riehl et al., 1996; Mi et al., 1998; Lyckman et al., 2000; Masai et al., 2003). Therefore, spatiotemporally regulated ADAM activities might plausibly coordinate visual projection development, as also supported by metalloproteinase inhibitory studies in *Xenopus* (Webber et al., 2002).

Sfrps are bimodular, highly diffusible factors, which, in addition to acting as negative and positive modulators of Wnt signaling (Bovolenta et al., 2008; Mii and Taira, 2009; Esteve et al., 2011a), interact with metalloproteinase of the Tolloid and ADAM families, thereby controlling the processing of their respective substrates (Lee et al., 2006; Muraoka et al., 2006; Kobayashi et al., 2009; Esteve et al., 2011b). *Sfrp1* and *Sfrp2* are strongly expressed during vertebrate eye development (Terry et al., 2000; Liu et al., 2003a; Blackshaw et al., 2004). In mice, *Sfrp1* and *Sfrp2* are redundantly required to specify the periphery of the retina by promoting canonical Wnt signaling activation (Esteve et al., 2011a) and to control retinal neurogenesis by inhibiting ADAM10 activity (Esteve et al., 2011b). Furthermore, chick and mouse RGC axons respond to *Sfrp1* (Rodríguez et al., 2005; Sebastián-Serrano et al., 2012) and exposure of *Xenopus* RGC growth cones to a focalized source of the protein reorients their growth with a mechanism that involves the expression of the Frizzled 2 receptor (Rodríguez et al., 2005).

Here, we show that, in the absence of *Sfrp1* and *Sfrp2*, RGC axons are less tightly packed and make subtle but significant mistakes as they grow along their pathway. These defects are explained by the multifunctional role of Sfrp proteins in the regulation of cell–cell communication, which involves both direct signaling at the growth cone and the control of proteolytic processing of other relevant guidance cues.

Materials and Methods

Animals. *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{+/−} mice were generated and intercrossed or backcrossed to C57BL/6J to obtain the different single or double *Sfrp1*^{−/−} and *Sfrp2*^{−/−} and control wild-type (wt) mice (Satoh et al., 2006; Esteve et al., 2011b). Embryos of either sex were obtained from timed mating of the resulting strains. The date of the vaginal plug was considered as embryonic day 0.5 (E0.5). Compound mutant embryos do not survive beyond E16–E16.5, limiting their analysis (Satoh et al., 2006; Esteve et al., 2011b). Animals were used according to institutional and national guidelines.

In situ hybridization. For *in situ* hybridization (ISH), E14.5 embryos were fixed by immersion in 4% PFA in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.2, for 3 h. Older embryos were transcardially perfused with the same fixative and postfixed for 2 h. Tissue was washed in PBS, cryoprotected overnight in 30% sucrose/PBS solution, embedded, and frozen in 7.5:15% gelatin/sucrose solution and serial sectioned in the frontal plane using a cryostat (Leica). ISH was performed as described previously (Marcos et al., 2009) with the following specific probes: *Sfrp1*, *Sfrp2*, *Shh*, *Netrin1*, *EphB2*, *Adam10* and the heterologous rat *Slit1*, *Slit2*, and *Robo2*.

Immunostaining. Cryosections were permeabilized with PBS containing 0.1% Triton X-100 (PBT) and immunostained in PBT containing 1% normal goat serum with the following primary antibodies: rabbit anti-Sfrp1 (1:500; Abcam), rat anti-Sfrp2 (a kind gift from S. Hauck; (Hauck et al., 2012), mouse anti-βIII-tubulin (TuJ1; 1:1000; Promega), rabbit anti-neurofilament M (1:500; Millipore), goat anti-Robo2 (1:500, a kind gift from Prof. F. Murakami (Tamada et al., 2008); rabbit anti-L1-CAM (1:500; (Lemmon et al., 1989); mouse anti-N-cadherin (1:500; Invitrogen). Primary antibodies were detected with Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 568 (Invitrogen), or biotin-conjugated (Jackson Laboratory) specific sec-

ondary antibodies (1:1000). Biotin IgGs were visualized using streptavidin-POD followed by DAB incubation. For immunofluorescence, sections were counterstained with DAPI (1 μg/ml; Vector Laboratories). Sfrp2 immunosignal in Figure 1, *I–L'*, was amplified with tyramide (PerkinElmer).

DiI and DiO tracing. The path of RGC axons was visualized using a 0.4% solution of 1,1'-diiododecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine (DiI, D282) or 3,3'-diiododecyl-3,3',3'-tetramethylindocarbocyanine perchlorate (DiO, D275; Invitrogen) dissolved in 4:10% dimethylformamide/sucrose solution. For intraretinal tracings, E15.5 retinas were dissected out, fixed with 4% PFA, and a tiny amount of DiI or DiO solution was injected in the dorsal or ventral periphery. Tissue was thereafter incubated for 1 h at 37°C. For unilateral anterograde tracings, the lens was removed from E15.5 heads to expose the OD, into which a small DiI crystal was inserted. Heads were stored in the dark for 2 weeks at 37°C. Brains were then dissected, the telencephalic vesicles were removed, and the exposed optic chiasm and tract were analyzed. For unilateral retrograde tracings, E15.5 heads were fixed as above, brains were carefully freed from the ventral skull, and small DiI crystals were placed in the initial segment of the optic tract. Heads were stored in the dark for 2 weeks at 37°C. Thereafter, both eyes were isolated, embedded in 4% agarose, and sectioned at 50 μm thickness with a vibratome (Leica).

Retinal explants. Explants from E15.5 wt or *Sfrp2*^{−/−} and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} central retinas were grown on glass coverslips coated with poly-D-lysine (10 μg/ml; Sigma) and laminin (10 μg/ml; Invitrogen) in DMEM/F12/N2 (Invitrogen) at 37°C as described previously (Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). Explants were grown in the presence or absence of purified Sfrp1 (500 ng/ml; Sigma; Esteve et al., 2003), the ADAM10-specific inhibitor GI254023X resuspended in DMSO (5 μM; a gift from Dr. A. Ludwig; Ludwig et al., 2005), or DMSO alone. After 48 h, explants were fixed in 2% PFA containing 11% sucrose at 37°C and stained with anti-βIII-tubulin antibodies. To determine the effect of ADAM10 on retinal axon fasciculation *in vitro*, E13.5 embryos (at least 10 for each condition) were electroporated *ex utero* with pRK5M-Adam10 (catalog #31717; Addgene) mixed with pCAG-GFP (5:1) or pCAG-GFP alone. Soon after, retinas were isolated and incubated in DMEM/F12/N2 (Invitrogen) overnight. The targeted GFP-positive regions of the retinas were dissected and grown as explants as described above. After 48 h, explants were fixed and immunostained with antibodies against GFP and anti-βIII-tubulin.

Western blots. E16.5 retinas, together with the optic nerves and tracts from wt, *Sfrp1*^{−/−}, *Sfrp2*^{−/−}, and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} embryos, were isolated and homogenized in lysis buffer (150 mM NaCl, 2% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 8) supplemented with a proteinase inhibitor mixture (Roche) and PMSF. In other experiments, retinal explants electroporated as described above were washed from the culture medium and directly incubated in a modified lysis buffer (150 mM NaCl, 2% Triton X-100, 50 mM Tris, pH 8, 10 mM CaCl₂) supplemented with a mixture of proteinase inhibitors (Roche) and PMSF. In all cases, protein content was quantified and tissue extracts (50 μg) were separated by electrophoresis on SDS polyacrylamide gels and transferred onto PVDF membranes. After blocking in TBS/0.1% Tween/5% nonfat milk, the membranes were incubated overnight at 4°C with rabbit polyclonal 74-5H7 that recognizes the L1 cytoplasmic portion (a kind gift from Dr. V. Lemmon; Lemmon et al., 1989) or mouse mAb against the C-terminal domain of N-cadherin (1:500; Invitrogen) and mouse anti-α-tubulin (1:10,000; Sigma) used as a loading control. Membranes were then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies followed by ECL Advanced Western Blotting Detection Kit (GE Healthcare). The immunoreactive bands were quantified by densitometry and the amount of proteolyzed fragment was calculated as the ratio of fragment/native/α-tubulin band values. Western blots were repeated at least three times, obtaining very similar results. To determine the specificity of α-Sfrp2 antibody, eyes from E14.5 wt and *Sfrp2*^{−/−} embryos were processed as above. Lysates were incubated with heparin-acrylic beads (Sigma) for 1 h and beads were recovered by centrifugation. Heparin-binding proteins were resolved on SDS polyacrylamide gels, transferred, and the PDVF membrane incubated with an anti-Sfrp2 antibody. The membrane was processed as above.

Image and statistical analysis. Tissue was analyzed with M205FA stereomicroscope or a DM CTR5000 microscope equipped for fluorescence microscopy and photographed with a DFC500 camera (Leica Microsystems). Confocal analysis was performed with LSM510 META equipment (Zeiss). Quantitative analysis was performed using ImageJ software. At least 10 explants per condition were analyzed to quantify axon fasciculation. Three images per explant were acquired. A line was drawn perpendicular to the axis of main neurite outgrowth and gray values along this line were recorded. The width of axon fascicles was calculated as the number of consecutive points with gray values >25 present along the established line (values <25 were considered background). Student's *t* test and Bonferroni's test were used to compare mean values of fascicle width calculated for the different conditions. Differences between calculated averages were considered significant when $p < 0.05$. The degree of axon fasciculation was also determined as the percentage of fascicles with width greater than or equal to the given pixels as indicated in the figures. In ADAM10-overexpression experiments, the degree of axon fasciculation was evaluated as the percentage of green fascicles, with the procedure described above.

Results

Sfrp1 and *Sfrp2* are expressed in the eye and distributed along the mouse visual pathway

Previous studies showed that *Sfrp1* and *Sfrp2* are expressed during eye development. In chick and medaka fish, *Sfrp1* mRNA localizes to the retinal neuroepithelium, the OD, chiasm, and the initial portion of the optic tract (Terry et al., 2000; Esteve et al., 2003; Esteve et al., 2004; Rodríguez et al., 2005). In mice instead, *Sfrp1* mRNA was detected in the retinal pigment epithelium, the ciliary margin (Liu et al., 2003a; Esteve et al., 2011b), and the RGC layer (Fig. 1*A*), but not in the chiasm or the optic tract region (Fig. 1*C* and data not shown). Consistent with the expression in RGC, *Sfrp1* protein localized to the growing RGC axons both *in vivo* and in dissociated cultures (Fig. 1*B,D,E*). *Sfrp2*, which mostly localizes to the RGC layer in the chick retina (Lin et al., 2007), was instead strongly expressed in the undifferentiated retinal neuroepithelium and in the proximal portion of the developing optic stalk (Fig. 1*F*). With development, *Sfrp2* expression progressively became downregulated in the central retina forming a central^{low} to peripheral^{high} gradient in the dorsal retina, but maintained an even distribution in the ventral retina and in the glial cells that form the OD (Morcillo et al., 2006) (Fig. 1*G*). *Sfrp2* mRNA was still clearly detected in the retinal neuroepithelium at E16.5 with levels that became progressively lower up to birth (data not shown), also as described previously (Blackshaw et al., 2004; Trimarchi et al., 2008). Immunostaining with an antibody that specifically recognized the *Sfrp2* protein (Hauck et al., 2012), as confirmed by the lack of specific signal in *Sfrp2*^{−/−} embryos in both immunostaining and Western blot analysis (Fig. 1*L,L',J,M*), demonstrated that *Sfrp2* protein, in addition to that in the retinal progenitors (Fig. 1*H,I,K*), specifically localizes to nascent RGCs and in their axons at E13.5 (Fig. 1*H*), as well as in cells of the distal optic nerve (Fig. 1*K'*). *Sfrp2* was not expressed in the ciliary margins (Fig. 1*F,G,I*; (Liu et al., 2003a; Esteve et al., 2011b) or the diencephalon (data not shown).

Together, these data indicate that there are species-specific differences in the expression of *Sfrp1* and *Sfrp2* in the developing visual pathway. In mouse embryos, their pattern of distribution suggests a potential role in establishing a proper RGC axon trajectory.

Sfrp2 and *Sfrp1* are required for correct intraretinal RGC pathfinding

We investigated whether genetic inactivation of *Sfrp1* and *Sfrp2* has functional consequences in RGC axon growth. Because *Sfrp2*

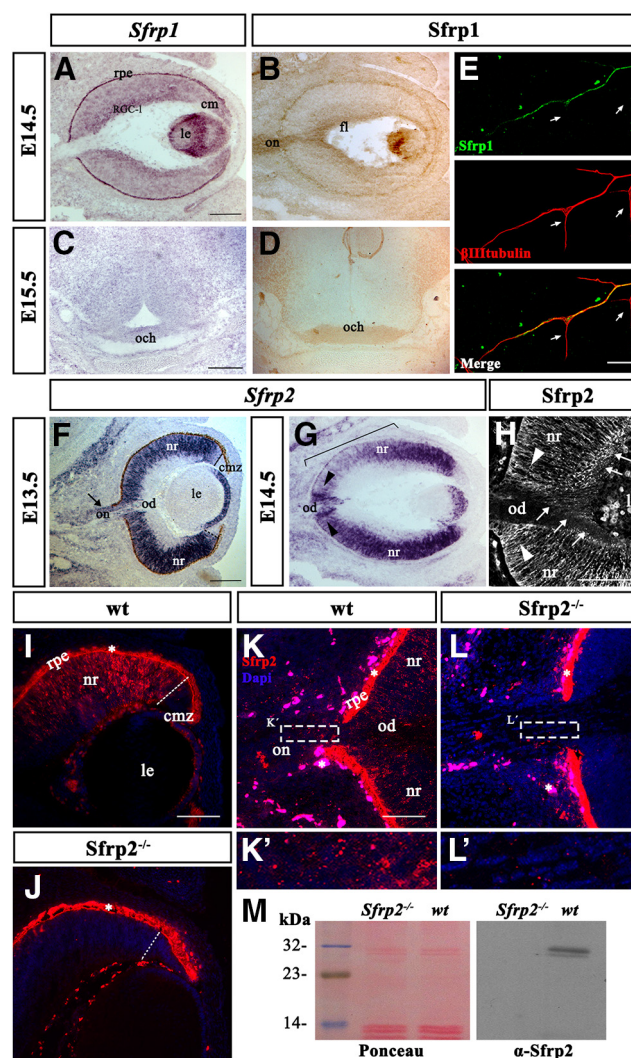


Figure 1. Expression of *Sfrp1* and *Sfrp2* in the proximal visual pathway. Transverse sections of E14.5 (*A, B, G*) and E13.5 (*F, H, I–L'*) retinas and E15.5 diencephalon (*C, D*) from wild-type (*A–D, F–K'*) and *Sfrp2*^{−/−} (*J, L, L'*) embryos hybridized with probes for *Sfrp1* (*A, C*) and *Sfrp2* (*F, G*) or immunostained with α -*Sfrp1* (*B, D*) or α -*Sfrp2* antibodies (*H–L'*). *E*, Dissociated culture from wt E14.5 retinas coimmunostained with α -*Sfrp1* (green) and α - β -tubulin (red) antibodies. Note the expression of *Sfrp1* in the RGC layer (RGC-I), retina pigmented epithelium (rpe), ciliary margins (cm), and lens (le). Note also that *Sfrp1* mRNA is not present in the optic chiasm (och). *Sfrp1* protein is abundantly detected in the RGC axons as they extend along the fiber layer (fl), optic nerve (on), and chiasm (*B, D*). This localization is confirmed in cultured neurons, where *Sfrp1* localizes to the main neurite but it is absent from collateral branches (*E*, arrows). *Sfrp2* mRNA localizes instead to the proliferating neural retina (nr), and the initial portion of the developing optic nerve (on, arrow in *F*) and the glial cells of the OD (od; arrowheads in *G*) and lens, but it is absent from differentiated RGCs and the ciliary margins (cmz). At E14.5, *Sfrp2* expression in the dorsal-central retina begins to be downregulated (bracket in *G*). As demonstrated by the lack of any specific signal in *Sfrp2* mutant embryos (*J, L, L'*), *Sfrp2* protein was specifically detected not only in the retinal progenitors but also in the nascent retinal ganglion cells (rgc) and their axons (*H*, arrows) as well as in cells of the optic nerve (*K'*). Asterisks in *I–L* indicate autofluorescent signal from the retina pigmented epithelium (rpe) and the red blood cells. *M*, Western blot analysis of *Sfrp2* expression in heparin purified extracts of eyes from E14 wt and *Sfrp2*^{−/−} embryos. Note the presence of a specific band in wt but not mutant retinas (right). Each lane contains an equal amount of proteins as defined by Ponceau staining (left). Scale bars: 250 μ m (*F, G*); 200 μ m (*A–D*); 100 μ m (*I–L*); 20 μ m (*K', L'*).

and *Sfrp1* are both expressed in the eye cup, we first searched for possible intraretinal pathfinding defects in single and compound mutant embryos.

Once generated, RGCs extend an axon that enters the fiber layer and grows with a radial orientation toward the OD posi-

tioned in the center of the retina. Therefore, axons of early-born RGCs, generated around the OD, have a short intraretinal growth, whereas those of late-born peripheral RGCs travel a longer distance before reaching the OD (Bao, 2008). To visualize this intraretinal trajectory, coronal sections and flat mounts from E15.5 wt and mutant retinas were immunostained with antibodies against neurofilament M that mostly label RGC axons at this stage (Fig. 2*A–I*). In wt and *Sfrp1*^{−/−} retinas, axons were normally oriented toward the fiber layer, forming small, radially arranged bundles that never invaded the deeper layers of the retina (Fig. 2*A, D, G* and data not shown). In contrast, in *Sfrp2*^{−/−} and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} mutants, a significant amount of RGCs, mostly located at the periphery, aberrantly extended their axon toward the ventricular surface of the retina (Fig. 2*B, C, J*). Confocal analysis of the outer layers in flat-mounted preparations confirmed the presence of a significant amount of small ectopic axon bundles (Fig. 2*H, I, K*), a phenotype also observed upon inactivation of Robo-Slit signaling (Thompson et al., 2006b; Thompson et al., 2009). Ectopic fibers were most abundant in the ventral peripheral retina but nearly absent from the OD region (Fig. 2*K*). The frequency of these defects was consistent in all compound mutants analyzed, in agreement with the proposed *Sfrp1*/*Sfrp2* functional redundancy (Satoh et al., 2006; Esteve et al., 2011b), but rather variable in *Sfrp2*^{−/−} embryos, in which the number of ectopic axon bundles spanned from 5 to 60 per retina. In addition to these defects, in *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} retinas, a fraction of axons turned away from the OD, taking routes perpendicular to the main plane of growth (Fig. 2*F*). Despite these abnormal trajectories, at least part of the misrouted axons eventually left the eye because insertion of DiI crystals in the optic tract retrogradely labeled misprojecting RGCs in the periphery of the retina (Fig. 2*L–N*).

To define more precisely intraretinal axonal misprojections and to estimate their frequency, the trajectory of discrete axon bundles was visualized by the insertion of tiny crystals of DiI and DiO into the dorsal and ventral retinal periphery, respectively (Fig. 3*A*). This approach confirmed that in wt and *Sfrp1*^{−/−} embryos RGC axons grew straight to the OD with occasional wiggling around its entry point (Fig. 3*B, C, H*) but ~50% of the traced *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} retinas contained axons that either individually or in small

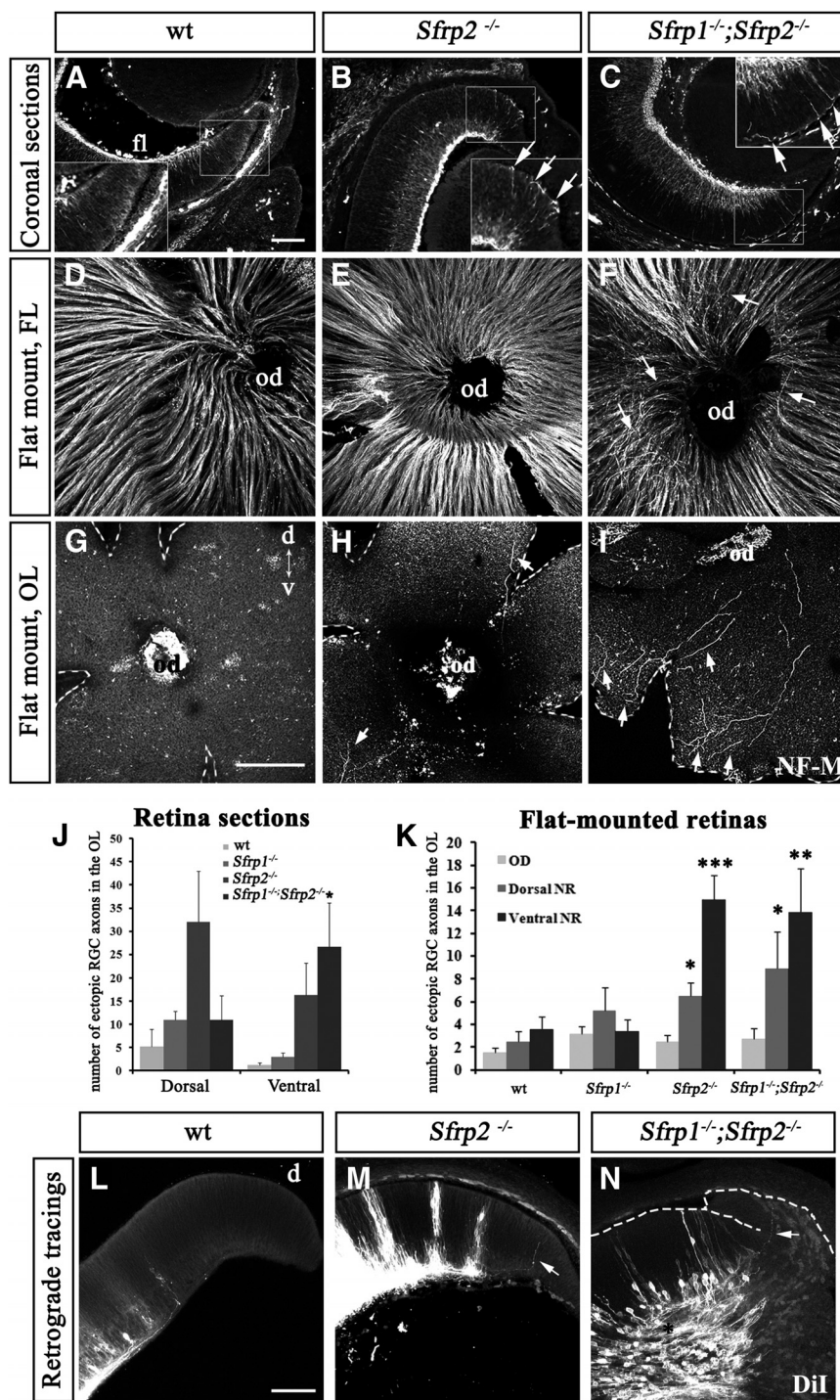


Figure 2. *Sfrp1/2* are required for correct intraretinal organization of RGC axons. Coronal sections (*A–C*) and flat mounts (*D–I*) of retinas from E15.5 wt, *Sfrp2*^{−/−}, and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} embryos immunostained with α -NF-M antibodies. Images in *D–I* are confocal planes of the fiber (*D–F*) and outer (*G–I*) layers of the retinas. Note that, in wt, all RGC axons extend toward the fiber layer (fl, in *A*), whereas in the mutants, several axons from peripheral RGCs invade the outer retina (arrows in insets *B, C*). Image in *B* shows the dorsal retina; images in *A* and *C*, the ventral retina. Axons invading the outer retina are also observed in flat-mount preparations (*H, I*). Note also that, in compound mutants, RGC axon bundles in the fiber layer are less defined and often present axons abnormally extending away from the OD (od, arrowheads in *F*). *J*, Mean \pm SEM number of ectopic axons per coronal section in the dorsal or ventral periphery of wt ($n = 6$), *Sfrp1*^{−/−} ($n = 10$), *Sfrp2*^{−/−} ($n = 6$), and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} ($n = 6$) deficient retinas. $p < 0.05$ compared with wt. *K*, Mean \pm SEM number of axons or small axon bundles located in the OD region, in the dorsal or ventral outer retina in wt ($n = 12$), *Sfrp1*^{−/−} ($n = 19$), *Sfrp2*^{−/−} ($n = 14$), and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} ($n = 8$) flat-mounted retinal preparations. $p < 0.05$; $***p < 0.01$; $****p < 0.001$ compared with wt; Student's *t* test. *L–N*, Coronal sections of wt (*L*), *Sfrp2*^{−/−} (*M*), and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} (*N*) E15.5 retinas after DiI retrograde tracings from the optic tract. Note that, in *Sfrp2*^{−/−} and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} embryos, few traced axons take abnormal trajectories. Please note the increased number of RGCs in the double mutant (asterisk in *N*) as already described (Esteve et al., 2011b). Scale bars, 200 μ m (*A–I*; *L–N*).

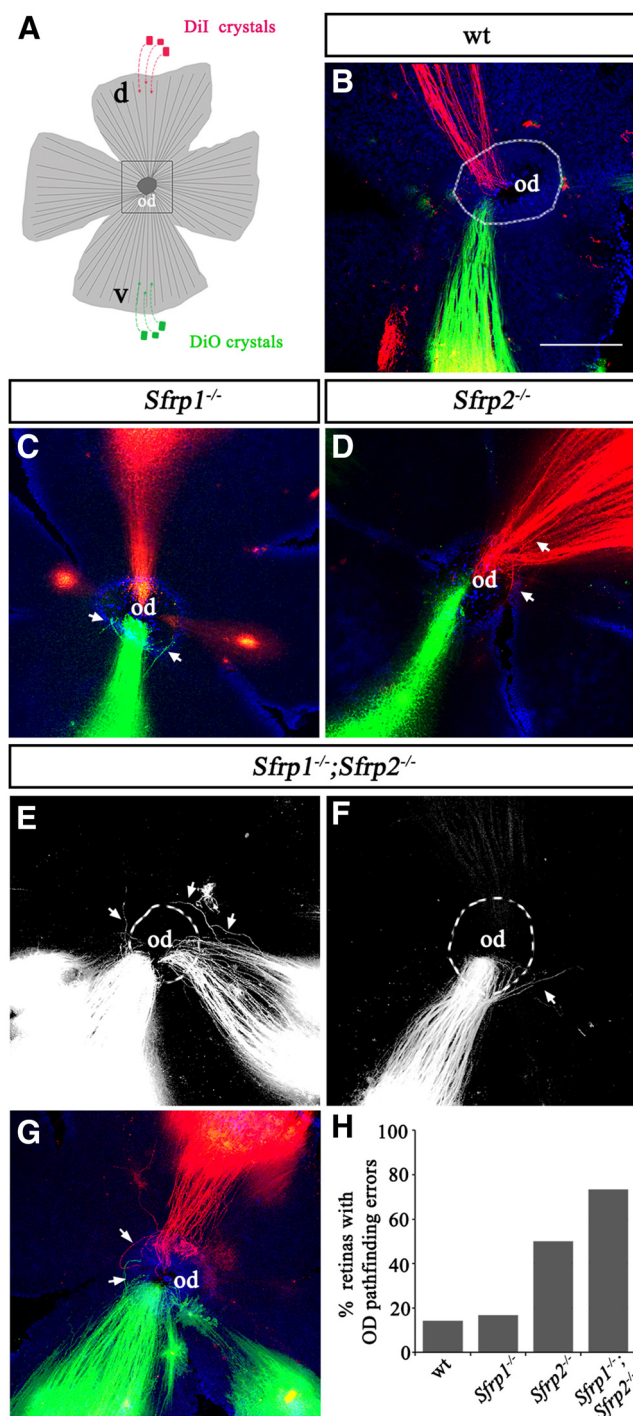


Figure 3. A proportion of RGC axons fail to enter the OD in the absence of *Sfrp2*. **A**, Schematic representation of the tracing strategy using crystals of DiI (red) and DiO (green) in the dorsal (d) and ventral (v) retina, respectively. **B–G**, Fluorescent images of flat-mounted preparations from E15.5 wt (**B**), *Sfrp1*^{-/-} (**C**), *Sfrp2*^{-/-} (**D**), and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**E–G**) retinas. Dashed lines indicate the position of the OD. Note that wt axons from the dorsal and ventral retina extend straight into the OD (**B**), whereas a small proportion of axons avoid the OD in mutants (arrows, **C–G**). **H**, Percentage of DiI- and DiO-labeled retinas with axons that fail to enter or detour around the OD in wt ($n = 14$), *Sfrp1*^{-/-} ($n = 36$), *Sfrp2*^{-/-} ($n = 20$), and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} ($n = 30$). Scale bars, 200 μ m (**B–G**).

bundles grew away from the OD (Fig. 3E–H). These defects were more severe and frequent in the ventral retina (67% vs 33% dorsal). Notably, tracing uncovered similar, but less frequent, defects in *Sfrp2*^{-/-} embryos (Fig. 3D,H), which had passed unnoticed in immunostained preparations (Fig. 2E).

Together, these results indicate that *Sfrp2* and *Sfrp1* influence the intraretinal growth of RGC axons by preventing axons to invade the deep layers of the retina and by fostering their turning into the OD. The prevalence of defects in the ventral retina likely reflects the enrichment of *Sfrp2* expression in these regions.

Sfrps are required for proper growth of RGC axons at the chiasm and tract regions

After leaving the OD, RGC axons navigate along the optic nerve toward the ventral midline of the diencephalon, where axons from the two eyes meet to form the optic chiasm. In mice, the majority of axons cross the midline and enter the contralateral optic tract, whereas a small proportion arising from the ventro-temporal RGCs remains uncrossed and projects into the ipsilateral tract (Petros et al., 2008). In contrast to the chick (Rodríguez et al., 2005), *Sfrp1* and *Sfrp2* were not expressed in the diencephalon, but they were found along the axons (Fig. 1B,D,I,K), prompting us to search for additional alterations.

Upon complete unilateral DiI filling of the optic nerve, RGC axons from E15.5 wt, *Sfrp1*^{-/-}, and *Sfrp2*^{-/-} embryos showed a normal sorting behavior at the midline (Fig. 4A–C), with few fibers, slightly more abundant in the mutants, invading the contralateral optic nerve as reported previously (Plump et al., 2002; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). However, in *Sfrp2*^{-/-} and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} embryos, a significant number of axons defasciculated prematurely at the distal end of the nerve and thereafter looped back into the chiasm (Fig. 4C,D,H), which appeared more loosely packed (Fig. 4C–F). This defect was more evident in *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} embryos: in ~80% of the double mutants ($n = 23$), axons were dispersed in the anterior–posterior axis (Fig. 4D). In the remaining 20%, the chiasm showed a phenotype similar to that described for *Slit1*^{-/-}; *Slit2*^{-/-} or *Robo2*^{-/-} embryos (Plump et al., 2002; Plachez et al., 2008). Many disheveled fibers crossed the midline anterior to the chiasm, sometimes forming an additional bundle and with a few axons taking aberrant anterior routes (Fig. 4E). In the most extreme case, fibers appeared randomly distributed, equally dividing into the ipsilateral and contralateral tract and nerve (Fig. 4F). DiI tracings of the different genotypes at E13.5, when the first set of RGC axons reach the chiasm, demonstrated a mild anterior dispersion of RGC axons at the double mutant chiasm and a comparable organization of the axons in wt, *Sfrp1*^{-/-}, and *Sfrp2*^{-/-} embryos (Fig. 4G). This indicates that late-born axons are more dependent on Sfrp-mediated axon fasciculation/guidance than early generated, pioneer axons.

Once they cross the midline, wt RGC axons extend along the tract in fasciculated bundles and fan out as they approach the LGN (Fig. 5A). In *Sfrp1*^{-/-} and, more evidently, in *Sfrp2*^{-/-} brains, this fanning was premature and its width significantly accentuated (Fig. 5A–C,E–G,I). In addition, some fibers aberrantly extended toward the dorsal diencephalon (Fig. 5E–G,I), as reported for *Robo2* mutants (Plachez et al., 2008). The latter behavior was more evident in compound mutants, possibly explaining why their optic tract “fan” was narrower than that of wt (Fig. 5D,H–J). This difference in width may also be explained by the presence of mediolateral defasciculation of the optic tract, which was evident upon brain sectioning (Fig. 5K,L). It may also in part reflect the shortening of the anteroposterior axis characteristic of double but not single Sfrp mutants (Satoh et al., 2006). Of note, the site of initial aberrant defasciculation of the optic tract, although similar among embryos of the same genotype, was distinct among the three genotypes (Fig. 5A–D, arrowheads),

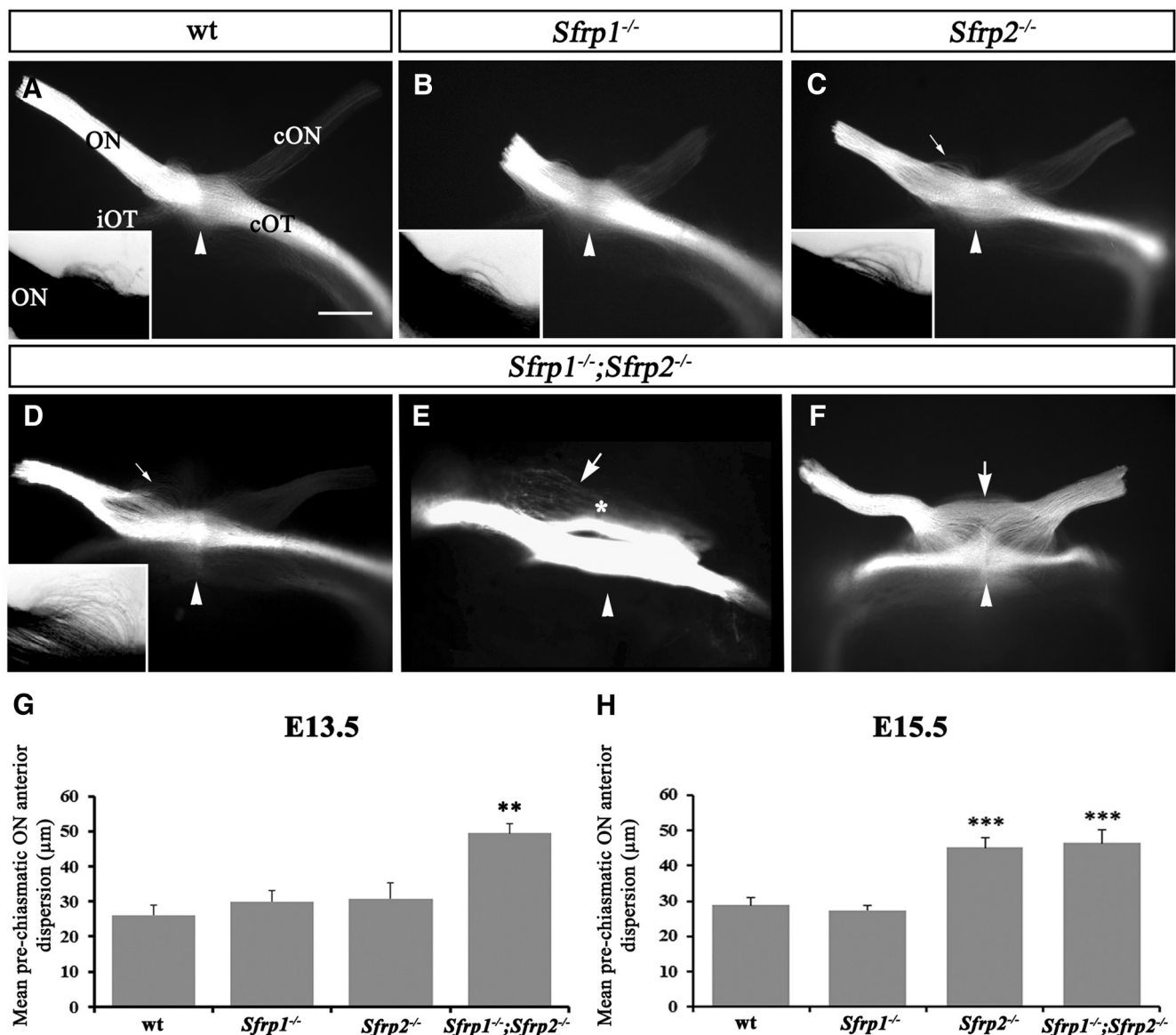


Figure 4. Sfrp's are required for proper growth of RGC axons at the chiasm. **A–F**, Ventral views of intact brain preparations from E15.5 wt (**A**), *Sfrp1*^{-/-} (**B**), *Sfrp2*^{-/-} (**C**), and *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (**D–F**) embryos. Axons from the right eye were traced by the insertion of Dil crystals into the OD. Anterior is to the top, posterior to the bottom. Arrowheads indicate the midline. Insets in **A–D** are high magnifications with inverted contrast of the prechiasmatic end of the optic nerve. In wt and *Sfrp1*^{-/-} (**A**, **B**), RGC axons extend into the optic nerve (ON) in tight bundles and slightly defasciculate as they enter the optic chiasm (inset). The majority of the axons enter the contralateral optic tract (cOT), whereas a small proportion remain uncrossed and grow into the ipsilateral optic tract (iOT) or enter the contralateral optic nerve (cON). The prechiasmatic end of the ON appears more defasciculated in *Sfrp2*^{-/-} and *Sfrp1*^{-/-};*Sfrp2*^{-/-} (arrows and insets in **C–E**). Note also the presence of small axon bundles (arrowhead in **E**). **F**, In extreme cases, fibers appear completely defasciculated, equally divided into the ipsilateral and contralateral tracts, with many axons entering the contralateral optic nerve. **G**, **H**, Mean ± SEM of the prechiasmatic dispersion of the optic nerve at E13.5 and E15.5. ***p* < 0.01; ****p* < 0.001 compared with wt (Student's *t* test). Scale bars, 200 μm (**A–F**).

suggesting no link to a specific cue present in the surrounding of the tract.

Sfrps influence compacted RGC axon growth with an ADAM10-dependent mechanism

Together, these data indicate that Sfrp's contribute both to intraretinal pathfinding of peripheral RGC axons and to fostering the organized growth of visual fibers along their pathway. Sfrp1 modulates mouse RGC axon growth (Sebastián-Serrano et al., 2012) and induces a bifunctional and extracellular matrix-dependent chemotropic turning response in chick and *Xenopus* RGC growth cones (Rodríguez et al., 2005). Therefore, Sfrp1 and Sfrp2, expressed in the retina and enriched at the OD (Fig. 1), likely act as intraretinal guidance cues, perhaps in combination

with extracellular matrix molecules. However, defects in regions of the pathway, in which there is no local Sfrp protein production, together with Sfrp protein localization along the RGC axons, suggested that an additional, perhaps autonomous mechanism might account for the axonal phenotype observed in *Sfrp* mutants.

Sfrp1 and Sfrp2 act as Wnt signaling inhibitors and thus their activity ultimately influences the expression of Wnt target genes (Bovolenta et al., 2008). We therefore considered the possibility that, in absence of *Sfrp1* and *Sfrp2*, the expression of axon guidance cues could be altered. Indeed, intraretinal defects related to those observed in *Sfrp* mutants have been reported in mice deficient in *EphB2*, *EphB3*, *Slit1/2*, *Robo2*, *BmpR1b*, and *Netrin1* (Deiner et al., 1997; Birgbauer et al., 2000; Liu et al., 2003b;

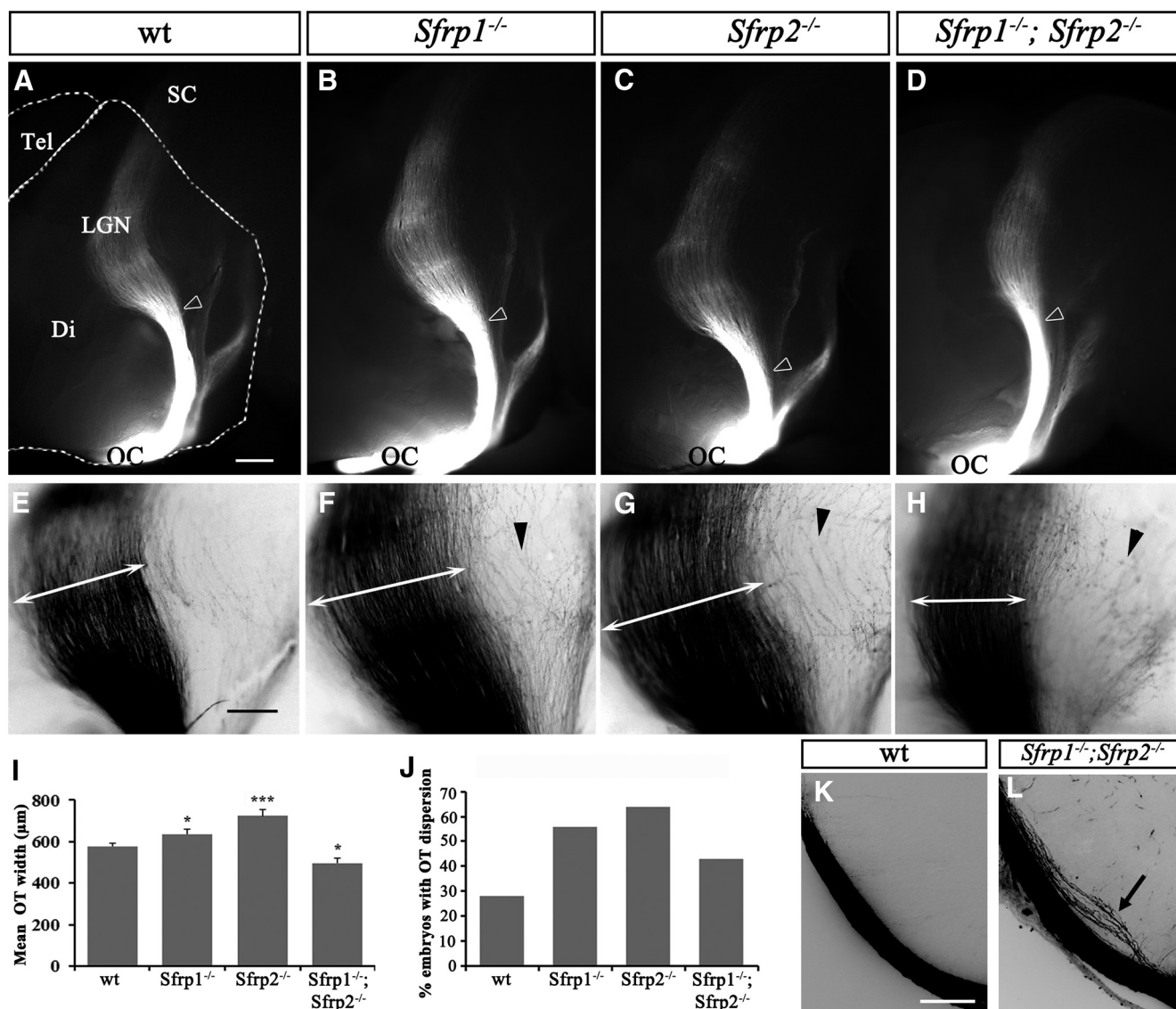


Figure 5. *Sfrp1* and *Sfrp2* deficiency causes premature defasciculation of axons in the optic tract. **A–H**, Lateral views of Dil-labeled RGC axons as they grow along the contralateral optic tract in whole brain preparations from E15.5 wt (**A**, **E**), *Sfrp1*^{-/-} (**B**, **F**), *Sfrp2*^{-/-} (**C**, **G**), and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**D**, **H**) embryos. The tract was exposed after cortex removal. In all images, dorsal is up and caudal is to the right. Open arrows in **A–D** point to the level in which the optic tract starts to fan out, which is slightly distinct among the genotypes. **E–H**, Images are higher magnifications at the level of the lateral geniculate nucleus (LGN) of those shown in **A–D**. The contrast has been inverted to better appreciate the caudal dispersion of labeled fibers (arrowheads). Double arrowed lines in **E–H** indicate the width occupied by Dil-labeled fibers as they approach the LGN. **I**, Mean \pm SEM of the optic tract width in wt ($n = 11$), *Sfrp1*^{-/-} ($n = 11$), *Sfrp2*^{-/-} ($n = 10$), and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} ($n = 11$) embryos at the level indicated in **E–H**. **J**, Percentage of Dil-labeled wt and mutant embryos with an evident caudal spreading of the optic tract. * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$ compared with wt (Student's t test). **K**, **L**, Fluorescent images with inverted contrast of frontal sections at the level of the optic tract from wt (**K**) and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**L**) E15.5 embryos after unilateral Dil filling of the visual fibers. Note the lateral to medial dispersion of the fibers in the compound mutants (arrow). Di, Diencephalon; OC, optic chiasm; SC, superior colliculus; Tel, telencephalon. Scale bars: 150 μ m (**A–D**), 100 μ m (**E–H**), 200 μ m (**K**, **L**).

Thompson et al., 2006b; Plachez et al., 2008; Thompson et al., 2009) and after interference with RGC-derived Shh signaling (Kolpak et al., 2005; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008). However, analysis of the mRNA distribution of *Netrin1*, *Shh*, *EphB2*, *Slit1*, *Slit2*, and *Robo2* in the eye of wt and *Sfrp1* and *Sfrp2* single and compound mutants revealed no significant differences (data not shown), suggesting that abnormal gene transcription was an unlikely cause of the observed phenotype.

We have previously shown that Sfrps act as negative modulators of ADAM10. Accordingly, the proteolysis of different ADAM10 substrates—Notch, APP, L1, and N-cadherin (Weber and Saftig, 2012)—is enhanced in *Sfrp*-null mice (Esteve et al., 2011b). *Adam10* mRNA, although expressed in the entire retinal neuroepithelium, was abundantly localized to the RGCs of both

wt and mutant E15.5 retinas (Fig. 6A–C) at similar levels, as also determined by semiquantitative RT-PCR analysis (data not shown). Therefore, Sfrp proteins localized to the RGC axons could control ADAM10 activity, which in turn would regulate, in an autonomous way, the shedding of membrane molecules involved in proper axon growth. If this were the case, the mode of outgrowth of retinal explants from wt or mutant embryos should be different. To test this possibility, we compared neurite outgrowth from E14.5 wt and single or compound mutant explants derived from different retinal quadrants to account for the non-homogeneous *Sfrp* distribution throughout the retinal neuroepithelium (Fig. 1). No significant difference in neurite length was observed between wt and mutants when outgrowth from each specific quadrant was compared, although there were intrinsic

outgrowth variations among quadrants (data not shown), as described previously (Marcus et al., 1996; Wang et al., 1996). Nevertheless, there was a consistent difference in the mode of outgrowth: explants from wt retinas in general extended arrays of tightly packed axonal bundles, whereas axons from *Sfrp2*^{-/-} and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} explants grew with a “sheet-like” appearance (Fig. 6D–F). High-power confocal analysis confirmed the preferential fasciculation of wt axons and the almost individual and disheveled growth of mutant axons (Fig. 6G–I), which was largely reverted upon addition of Sfrp1 protein to the culture medium (Fig. 6J–L). To quantify this behavior, we focused on *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} explants, which displayed the most evident phenotype. Measure of the mean width of wt and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} axon fascicles confirmed that *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} axons formed significantly thinner fascicles than those formed by wt axons (22.56 ± 4 vs 34.4 ± 5.6 pixels, $p = 0.0418$; Fig. 6P). The addition of Sfrp1 protein to the culture medium had a mild effect on the fasciculation of wt axons but caused a significant increase of the fascicle width in *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} explants (30.4 ± 2.63 vs 22.56 ± 4 pixels, $p = 0.0153$) with a value close to that of wt explants ($p = 0.438$; Fig. 6P). Furthermore, the proportion of fascicles wider than 60 pixels in *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} explants was ~3-fold less than that observed in wt explants (5.8% and 14.3% respectively), but Sfrp1 addition neared their fasciculation score to that observed in wt (14.37%; Fig. 6Q). A similar trend was observed upon addition of the ADAM10-specific inhibitor GI254023X (5 μ M; Fig. 6M–O), which made the outgrowth of *Sfrp2*^{-/-} retinal explants (13.53 ± 0.70)—taken as an example—comparable to that of wt (20.10 ± 1.10 vs 21.95 ± 1.82 , $p = 0.54$; Fig. 6R), increasing the proportion of wider fascicles to values similar to that of wt (Fig. 6S).

All in all, these data suggest that Sfrp proteins favor the fasciculated growth of RGC axons with a mechanism that implicates ADAM10. A recent study showed that *Drosophila* ADAM10/Kuzbanian is involved in Robo receptor activation (Coleman et al., 2010) and Sfrp1 interferes with Kuzbanian activity (Esteve et al., 2011b). Given the expression of Robos in RGCs and the similarity in the phenotypic traits of *Sfrp2*^{-/-}, *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} and *Robo2/Slit* mutants (Plump et al., 2002; Thompson et al., 2006a; Thompson et al., 2009), we first considered the possibility that ADAM10-mediated

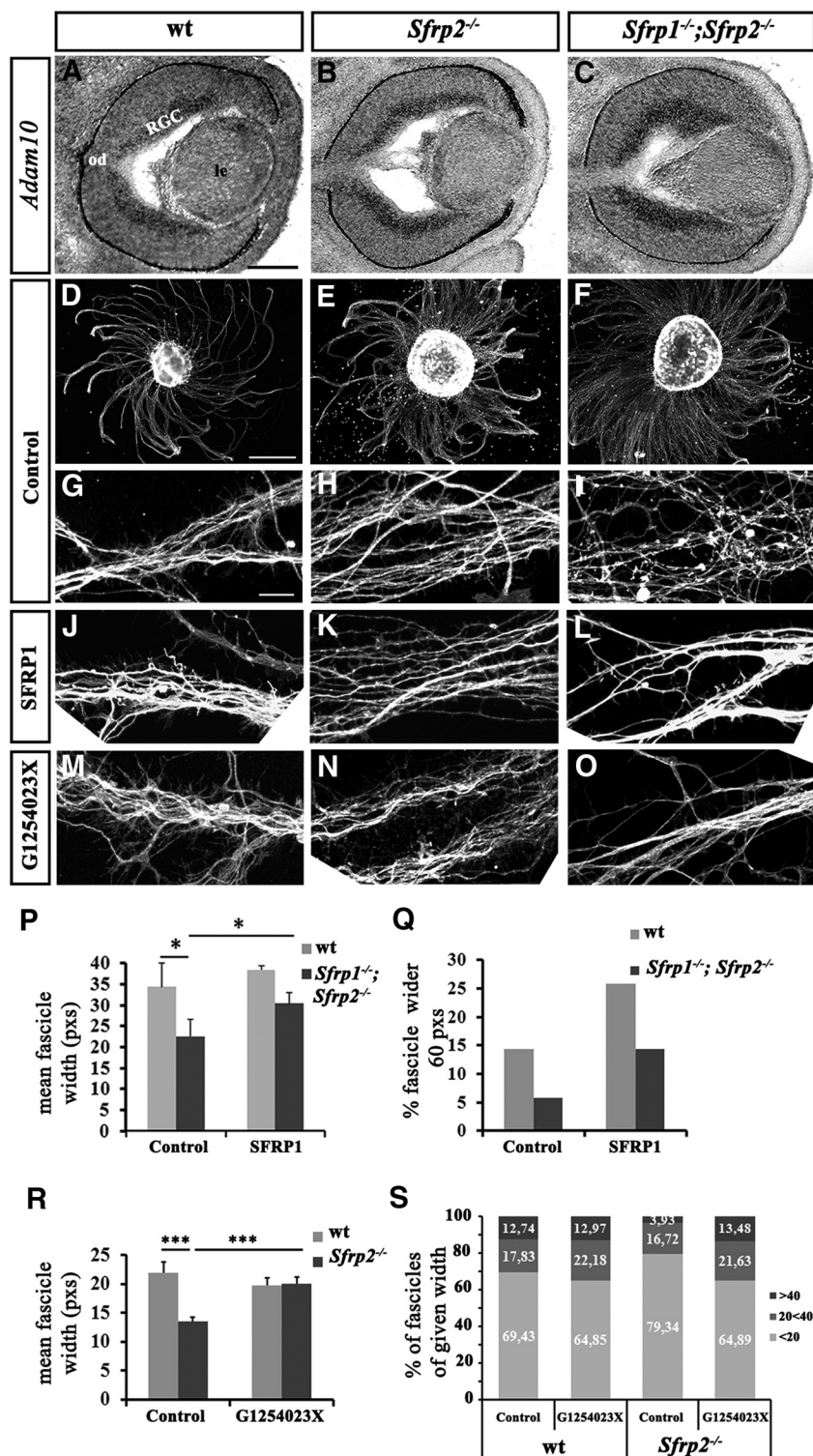


Figure 6. Fasciculated growth of RGC neurites requires modulation of ADAM activity by Sfrp's. **A–C**, Transverse sections of E15.5 retinas from wt, *Sfrp2*^{-/-} and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} embryos hybridized with a probe against *Adam10*. Note the strong *Adam10* expression in the RGC layer. In double mutants, the number of RGCs is increased as described previously (Esteve et al., 2011a). **D–O**, Low- and high-power views of retinal explants from E15.5 wt (**D**, **G**, **J**, **M**), *Sfrp2*^{-/-} (**E**, **H**, **K**, **N**) and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} (**F**, **I**, **L**, **O**) embryos cultured alone (**D–I**) or in the presence of Sfrp1 protein (**J–L**) or GI254023X, a specific ADAM10 inhibitor (**M–O**). **P**, Mean \pm SEM width of neurite fascicles of retinal explants from wt or *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} embryos cultured in different conditions. **Q**, Graph representing the proportion of fascicles wider than 60 pixels (pxs) in wt and *Sfrp1*^{-/-}; *Sfrp2*^{-/-} retinal explants grown with or without the addition of Sfrp1. **R**, Mean \pm SEM width of neurite fascicles of retinal explants from wt or *Sfrp2*^{-/-} retinas grown with DMSO (control) or GI254023X. **S**, Graph representing the proportion of fascicles of given width from wt and *Sfrp2*^{-/-} retinal explants grown with DMSO or GI254023X. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, Student's *t* test. Scale bars: 200 μ m (**A–C**), 200 μ m (**D–F**), 10 μ m (**G–O**).

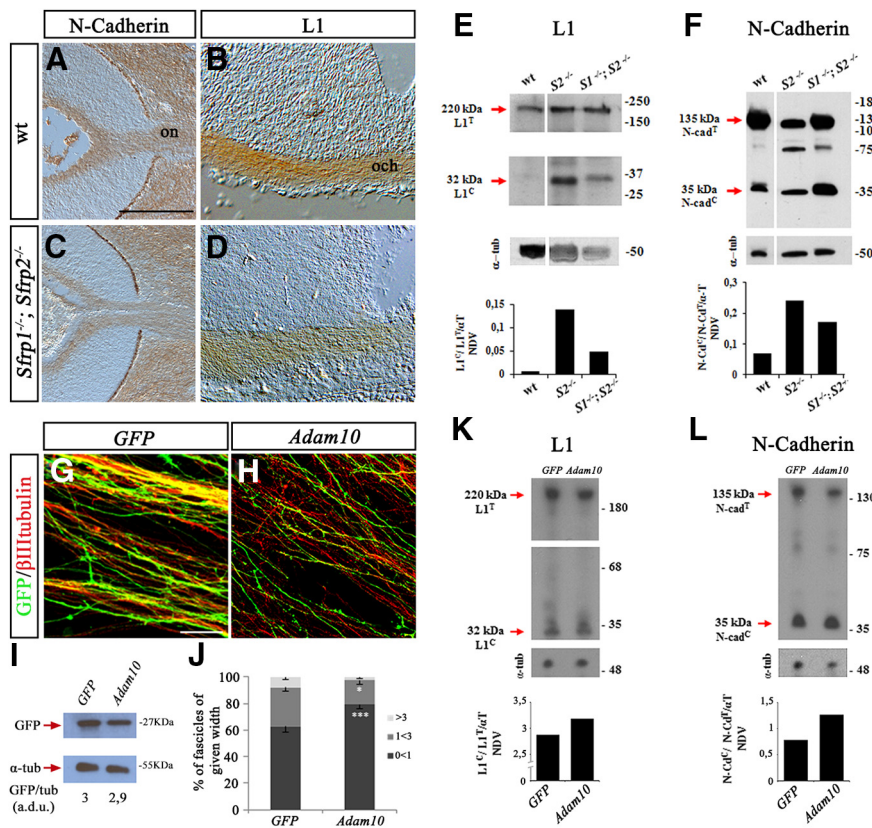


Figure 7. ADAM10 mediates disheveled RGC axon growth likely by regulating L1 and *N*-cadherin proteolysis. **A–D**, Transverse sections of E15.5 wt (**A**, **B**) and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} (**C**, **D**) embryos at the level of the eye (**A**, **C**) and optic chiasm (**B**, **D**). Sections are immunostained with α -*N*-cadherin (**A**, **C**) and α -L1 (**B**, **D**) antibodies. **E**, **F**, Western blot analysis of L1 (**E**) and *N*-cadherin (**F**) processing in lysates of the proximal visual pathway from E16.5 wt, *Sfrp2*^{−/−}, and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} embryos. The 32 kDa L1 and 35 kDa *N*-cadherin fragments are increased in *Sfrp2*^{−/−} and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} embryos, as shown in the graph bar representation of processed and unprocessed bands normalized to α -tubulin as a loading control. The data represent a typical experiment. The lane showing the wt lysate derives from the same gel, in which an intermediate lane was eliminated. **G**, **H**, Confocal images of the retinal explants electroporated with GFP (**G**) or GFP + *Adam10* (**H**) immunostained with antibodies against GFP and β -III-tubulin. Note that *Adam10* overexpression causes axon defasciculation. **I**, Western blot analysis of GFP demonstrating similar levels of explant targeting. GFP levels were normalized against α -tubulin. **J**, Graph representing the proportion of fascicles of given width from retinal explants electroporated with GFP or *Adam10*. *Adam10* significantly reduces the number of wider fascicles. **K**, **L**, Western blot analysis of L1 (**K**) and *N*-cadherin (**L**) processing in lysates of GFP and *Adam10*-electroporated retinal explants. Note the increased ratio of processed/unprocessed *N*-cadherin and L1 normalized to α -tubulin in *Adam10*-overexpressing explants. on, Optic nerve; och (optic chiasm). **p* < 0.05, ****p* < 0.001; Bonferroni's test. Scale bars: 200 μ m (**A–D**), 10 μ m (**G–H**).

Robo processing would be conserved in mammals and that its shedding would be increased in absence of Sfrp proteins. However, experiments with *Robo2*- and *Adam10*-transfected cell lines, as well as Western blot analysis of embryonic visual pathway lysates from wt and *Sfrp*-null genotypes did not reveal significant Robo2 processing (data not shown). We next analyzed whether *N*-cadherin and L1, two ADAM10-specific substrates (Reiss et al., 2005; Riedle et al., 2009) previously implicated in selective fasciculation of visual axons (Riehl et al., 1996; Mi et al., 1998; Lyckman et al., 2000; Masai et al., 2003), presented an enhanced proteolytic processing in the visual pathway of *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} mice, as previously observed in retinal tissue (Esteve et al., 2011b). Both molecules are strongly expressed in wt and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} E15.5 RGC axons (Fig. 7*A–D*), so their abnormal processing could collectively explain the *in vivo* and *in vitro* phenotype observed in *Sfrp* mutants. ADAM10 sheds the extracellular domain of L1 and *N*-cadherin and this is prerequisite for further proteolysis by a γ -secretase, which generates intracellular peptides of 35 kDa for *N*-cadherin and 28 kDa for L1 (Reiss et al., 2005; Riedle et

al., 2009). Western blot analysis of the relative proportion of these fragments from the isolated proximal visual pathway (from the retina to the LGN) of E16.5 wt, *Sfrp2*^{−/−}, and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} embryos revealed an increased shedding of L1 and *N*-cadherin in *Sfrp2*^{−/−} and *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} mutants compared with wt (Fig. 7*E,F*). Therefore, as demonstrated previously (Esteve et al., 2011b), genetic inactivation of Sfrp proteins seemed to increase ADAM10 activity, which likely impinged upon the fasciculated growth of RGC axons. If this were the case, then overexpression of ADAM10 in retinal explants should mimic the behavior of *Sfrp* mutant retinas. Indeed, electroporation of equal amounts of plasmids carrying either GFP or *Adam10* demonstrated that ADAM10-overexpressing axons extended rather independently, in contrast to control GFP-expressing axons, which formed small fascicles (Fig. 7*G–J*). This behavior was associated with an increased proteolysis of *N*-cadherin and L1 in *Adam10*-overexpressing explants (Fig. 7*K,L*), although this was less pronounced than that observed in *Sfrp* mutants (Fig. 7*E,F*), likely because only a proportion of RGCs are targeted by the electroporation.

Altogether, these data support the possibility that defasciculation defects observed in the absence of Sfrp1/2 are a consequence of abnormal ADAM10-mediated processing, at least of *N*-cadherin.

Discussion

Axon growth depends on the interplay of different molecular signals. Multifunctionality of one or few of such signals may be an efficient way of ensuring coordinated information. Shh signaling acting on spinal cord commissural axons is an example. Indeed, Shh secreted by the floor plate attract pre-crossing axons at the ventral midline and thereafter repel postcrossing axons to favor their anterior longitudinal growth (for review, see Bovolenta, 2005). At the same time, it ensures that axons acquire responsiveness to Semaphorin (Parra and Zou, 2010), a cue that also helps axons out of the midline (Nawabi et al., 2010). In the chick spinal cord, Shh signaling further controls the ventral expression of *Sfrp1*, which shapes the gradient of Wnt proteins that promote the longitudinal growth of commissural axons (Domanitskaya et al., 2010). In a different paradigm, we have shown here that Sfrp proteins are required for preventing RGC axons to invade the deep layers of the retina and to constrain their growth into the OD, likely with a direct mechanism (Rodríguez et al., 2005). At the same time, Sfrp's are needed to promote cohesive axon extension by ensuring the appropriate ADAM10-mediated shedding of cell adhesion molecules, further demonstrating that fine regulation of metalloproteinases is critical to coordinating the development of neuronal projections (McFarlane, 2003; Bai and Pfaff, 2011).

These conclusions are based on the analysis of single and compound *Sfrp1* and *Sfrp2* mouse mutants, which showed mild but

consistent defects in intraretinal pathfinding and fiber fasciculation. *Sfrp1* and *Sfrp2* are expressed with different and restricted patterns, but, consistent with their diffusible nature, immunostaining shows that Sfrp proteins localize more broadly than their mRNA, as reported in previous studies (Mii and Taira, 2009; Esteve et al., 2011a) and possibly explaining their functional redundancy (Sato et al., 2006; Esteve et al., 2011b). Consistent with this redundancy, compound *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−} mutants had the strongest phenotype, followed by *Sfrp2*^{−/−} embryos, whereas only subtle defects were observed in the *Sfrp1*^{−/−} mutants. Shortening of the anteroposterior axis, lack of retinal periphery, and increased number of RGCs found in compound mutants (Sato et al., 2006; Esteve et al., 2011a; Esteve et al., 2011b) may influence their axon phenotype. However, similar patterning defects were never observed in the *Sfrp2*^{−/−} mutants (Sato et al., 2006; Esteve et al., 2011a; Esteve et al., 2011b), which show a similar visual pathway phenotype, making this possibility unlikely. In addition, analysis of brain patterning of single and compound *Sfrp1* and *Sfrp2* mutants revealed predominant dorsal defects (I. Crespo, A.S., P.B., and P.E., unpublished data), compatible with their reported pallial and subpallial expression (Leimeister et al., 1998; Kim et al., 2001). In contrast, the retinal distribution of *Sfrp2* and, to a lesser extent, of *Sfrp1*, indicates that, normally, these proteins prevent RGC axons from invading the deep layers of the retina. As a result, in *Sfrp2*^{−/−} and *Sfrp1*^{−/−}; *Sfrp2*^{−/−} compound mutant embryos, a subset of ventroposterior RGC axons no longer stray away from the outer layers of the retina, resembling the defects described for *Robo2* and *Slit1* and *Slit2* compound mutants (Plump et al., 2002; Plachez et al., 2008). Similarly, the relative abundance of *Sfrp2* at the OD, which is fundamental for guiding axons out of the eye (Morcillo et al., 2006), explains the defects of outgrowth observed in this region in both *Sfrp2* and compound mutants. OD-derived Sfrp's, in combination with laminin localized to the optic nerve head (Höpker et al., 1999), may directly signal at the RGC growth cones forcing the axons to enter the OD. This mechanism would be similar to what has been shown for the combination of Netrin1 and laminin (Höpker et al., 1999) or proposed for laminin/EphB (Birgbauer et al., 2000; Suh et al., 2004). This is also in agreement with the observation that chick and *Xenopus* RGC axons are uniformly and strongly repelled by the combination of Sfrp1 and laminin in both turning and stripe assays and exposed brain preparations in which Sfrp1 addition deviates visual axon trajectory in regions of the optic tract, in which laminin is particularly abundant (Rodríguez et al., 2005).

Sfrp's are not expressed in region surrounding the visual pathway, suggesting that Sfrp proteins localized to the RGC axons could explain, in an autonomous way, the defects observed in the chiasm and optic tract region. Our data support this possibility, suggesting that abnormal RGC axon growth might in part be a consequence of an increased activity of ADAM10—abundantly expressed by RGCs caused by *Sfrp1* and *Sfrp2* genetic inactivation. In tissue culture, explants from Sfrp-null animals grow with a disheveled appearance, which is attenuated by the addition of either Sfrp1 or a specific inhibitor of ADAM10 metalloproteinase activity. Furthermore, electroporation of *Adam10* in retinal explants promotes a poorly cohesive growth of targeted axons that thus behave similarly to those of Sfrp mutant retinas. Shedding of L1 and N-cadherin, two of the multiple ADAM10 substrates, is increased in the visual pathway of *Sfrp*-null mice and in wt retinal explants overexpressing *Adam10*, although in the latter case, to a lesser extent because only a proportion of RGCs are targeted by electroporation. This abnormal processing may contribute to the

disheveled axon growth observed in both experimental paradigms. Supporting this possibility, L1 and N-cadherin have been involved in homophilic and heterophilic interactions (Hivert et al., 2002; Bao, 2008) and alteration of their expression causes visual axon defects resembling those observed in *Sfrp* mutants (Bastmeyer et al., 1995; Riehl et al., 1996; Mi et al., 1998; Lyckman et al., 2000; Masai et al., 2003). We cannot, however, exclude that abnormal processing of other guidance cues may contribute to the phenotypes we are describing. Although we could not demonstrate a role for ADAM10 in vertebrate Robo2 shedding, the Robo/Slit signaling system is still a good candidate, perhaps implicating the processing of Slits or a different Sfrp-modulated metalloproteinase (Bovolenta et al., 2008; also see below). In fact, *Sfrp2*^{−/−}, *Sfrp1*^{−/−};*Sfrp2*^{−/−}, *Robo2*, and *Slit* mutants share phenotypic traits (Plump et al., 2002; Thompson et al., 2006a; Thompson et al., 2009) and Slit-mediated activation of Robo2 has been implicated in axon fasciculation (Jaworski and Tessier-Lavigne, 2012). Furthermore, Robo receptors undergo homophilic interactions (Hivert et al., 2002) and have been implicated in zebrafish visual axon fasciculation (Devine and Key, 2008). Other molecules that we have not tested are also possible additional candidates: the Eph-Ephrin signaling pair is an example because these molecules are established ADAM10 substrates (Weber and Saftig, 2012) that contribute to intraretinal axon fasciculation (Mühleisen et al., 2006). A recent report has also suggested that ADAM proteinases participate in the shedding of Shh from the producing cells (Ohlig et al., 2011). Notably, interference with RGC-derived Shh causes intraretinal defects similar to those observed in *Sfrp1/2* mutants (Kolpak et al., 2005; Sánchez-Camacho and Bovolenta, 2008) and blockage of Shh signaling in *Xenopus* leads to defasciculation of the caudal optic tract (Gordon et al., 2010). Similarly, the Netrin1 receptor DCC, crucial for RGC axons navigation at the optic nerve head (Deiner et al., 1997), is shed by a metalloproteinase (Galko and Tessier-Lavigne, 2000).

Our study does not clearly establish whether ADAM10 is uniquely responsible for the disheveled growth observed in Sfrp mutants. The singularity of Sfrp/ADAM10 binding has not been addressed (Esteve et al., 2011b), so Sfrp proteins may interfere with other metalloproteinases. Indeed, although *Adam10* is the only ADAM family member enriched in RGCs, ADAM11, ADAM17, and ADAM28 are also found in the retina.

We propose a dual function for Sfrp1/2 in the guidance of RGC axons, but the phenotype resulting from the inactivation of one or both molecules is, perhaps surprisingly, mild and sometimes incompletely penetrant for these combined effects. There are several possible, diverse reasons. For example, the absence of Sfrp1/2 at the OD might be compensated by the presence of Netrin or EphB (Deiner et al., 1997; Birgbauer et al., 2000). *Sfrp5*, the member of the Sfrp family most closely related to *Sfrp1* and *Sfrp2* (Bovolenta et al., 2008), is expressed in the developing eye (Chang et al., 1999; Ruiz et al., 2009) and may in part compensate for *Sfrp1/2* deficiency. Furthermore, and likely more relevant, shedding of guidance cues should be considered as an ultimate layer of regulation that fine-tunes axon navigation and enhances its fidelity (Bai and Pfaff, 2011).

In conclusion, our study adds new evidence of the multiple roles that Sfrp proteins play in both development and adult tissue homeostasis (Esteve and Bovolenta, 2010). These functions are context dependent and may vary according to their localization, level of expression, and interaction with other molecules. The role of Sfrp proteins as modulators of shedding events is particularly intriguing because protein shedding regulates many basic

events in addition to axon guidance. These include cell adhesion, cell migration, inflammatory events or signaling activation, and extinction. Furthermore, sheddase-regulated proteins are expressed not only during initial brain wiring, but persist in the adult CNS and participate in the maintenance, repair, and plasticity of neural circuits (Saxena and Caroni, 2007). Our finding, therefore, might have important implications in neurodegenerative diseases or in vasculature formation, a process that is controlled by similar sets of molecules (Jones and Li, 2007). In this respect, it is interesting to note that *Sfrp* mutant mice have evident vasculature defects (Esteve et al., 2011b).

References

- Bai G, Pfaff SL (2011) Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron* 72:9–21. [CrossRef Medline](#)
- Bao ZZ (2008) Intraretinal projection of retinal ganglion cell axons as a model system for studying axon navigation. *Brain Res* 1192:165–177. [CrossRef Medline](#)
- Bastmeyer M, Ott H, Leppert CA, Stuermer CA (1995) Fish E587 glycoprotein, a member of the L1 family of cell adhesion molecules, participates in axonal fasciculation and the age-related order of ganglion cell axons in the goldfish retina. *J Cell Biol* 130:969–976. [CrossRef Medline](#)
- Birgbauer E, Cowan CA, Sretavan DW, Henkemeyer M (2000) Kinase independent function of EphB receptors in retinal axon pathfinding to the optic disc from dorsal but not ventral retina. *Development* 127:1231–1241. [Medline](#)
- Blackshaw S, Harpavat S, Trimarchi J, Cai L, Huang H, Kuo WP, Weber G, Lee K, Fraioli RE, Cho SH, Yung R, Asch E, Ohno-Machado L, Wong WH, Cepko CL (2004) Genomic analysis of mouse retinal development. *PLoS Biol* 2:E247. [CrossRef Medline](#)
- Bovolenta P (2005) Morphogen signaling at the vertebrate growth cone: a few cases or a general strategy? *J Neurobiol* 64:405–416. [CrossRef Medline](#)
- Bovolenta P, Mason C (1987) Growth cone morphology varies with position in the developing mouse visual pathway from retina to first targets. *J Neurosci* 7:1447–1460. [Medline](#)
- Bovolenta P, Esteve P, Ruiz JM, Cisneros E, Lopez-Rios J (2008) Beyond Wnt inhibition: new functions of secreted Frizzled-related proteins in development and disease. *J Cell Sci* 121:737–746. [CrossRef Medline](#)
- Chang JT, Esumi N, Moore K, Li Y, Zhang S, Chew C, Goodman B, Rattner A, Moody S, Stetten G, Campochiaro PA, Zack DJ (1999) Cloning and characterization of a secreted frizzled-related protein that is expressed by the retinal pigment epithelium. *Hum Mol Genet* 8:575–583. [CrossRef Medline](#)
- Coleman HA, Labrador JP, Chance RK, Bashaw GJ (2010) The Adam family metalloprotease Kuzbanian regulates the cleavage of the roundabout receptor to control axon repulsion at the midline. *Development* 137:2417–2426. [CrossRef Medline](#)
- Deiner MS, Kennedy TE, Fazeli A, Serafini T, Tessier-Lavigne M, Sretavan DW (1997) Netrin-1 and DCC mediate axon guidance locally at the optic disc: loss of function leads to optic nerve hypoplasia. *Neuron* 19:575–589. [CrossRef Medline](#)
- Devine CA, Key B (2008) Robo-Slit interactions regulate longitudinal axon pathfinding in the embryonic vertebrate brain. *Dev Biol* 313:371–383. [CrossRef Medline](#)
- Domanitskaya E, Wacker A, Mauti O, Baeriswyl T, Esteve P, Bovolenta P, Stoeckli ET (2010) Sonic hedgehog guides post-crossing commissural axons both directly and indirectly by regulating Wnt activity. *J Neurosci* 30:11167–11176. [CrossRef Medline](#)
- Erskine L, Herrera E (2014) Connecting the retina to the brain. *ASN Neuro* 6:p11759091414562107.
- Esteve P, Bovolenta P (2010) The advantages and disadvantages of *sfrp1* and *sfrp2* expression in pathological events. *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 221:11–17. [CrossRef Medline](#)
- Esteve P, Trouse F, Rodríguez J, Bovolenta P (2003) SFRP1 modulates retina cell differentiation through a beta-catenin-independent mechanism. *J Cell Sci* 116:2471–2481. [CrossRef Medline](#)
- Esteve P, Lopez-Rios J, Bovolenta P (2004) SFRP1 is required for the proper establishment of the eye field in the medaka fish. *Mech Dev* 121:687–701. [CrossRef Medline](#)
- Esteve P, Sandonis A, Ibañez C, Shimono A, Guerrero I, Bovolenta P (2011a) Secreted frizzled-related proteins are required for Wnt/beta-catenin signaling activation in the vertebrate optic cup. *Development* 138:4179–4184. [CrossRef Medline](#)
- Esteve P, Sandonis A, Cardozo M, Malapeira J, Ibañez C, Crespo I, Marcos S, Gonzalez-Garcia S, Toribio ML, Arribas J, Shimono A, Guerrero I, Bovolenta P (2011b) *Sfrp*'s act as negative modulators of ADAM10 to regulate retinal neurogenesis. *Nat Neurosci* 14:562–569. [CrossRef Medline](#)
- Galko MJ, Tessier-Lavigne M (2000) Function of an axonal chemoattractant modulated by metalloprotease activity. *Science* 289:1365–1367. [CrossRef Medline](#)
- Gordon L, Mansh M, Kinsman H, Morris AR (2010) *Xenopus* sonic hedgehog guides retinal axons along the optic tract. *Dev Dyn* 239:2921–2932. [CrossRef Medline](#)
- Hattori M, Osterfield M, Flanagan JG (2000) Regulated cleavage of a contact-mediated axon repellent. *Science* 289:1360–1365. [CrossRef Medline](#)
- Hauck SM, Hofmaier F, Dietter J, Swadzba ME, Blindert M, Amann B, Behler J, Kremmer E, Ueffing M, Deeg CA (2012) Label-free LC-MS/MS analysis of vitreous from autoimmune uveitis reveals a significant decrease in secreted Wnt signalling inhibitors DKK3 and SFRP2. *J Proteomics* 75:4545–4554. [CrossRef Medline](#)
- Hivert B, Liu Z, Chuang CY, Doherty P, Sundaresan V (2002) Robo1 and Robo2 are homophilic binding molecules that promote axonal growth. *Mol Cell Neurosci* 21:534–545. [CrossRef Medline](#)
- Höpker VH, Shewan D, Tessier-Lavigne M, Poo M, Holt C (1999) Growth-cone attraction to netrin-1 is converted to repulsion by laminin-1. *Nature* 401:69–73. [CrossRef Medline](#)
- Jaworski A, Tessier-Lavigne M (2012) Autocrine/juxtacrine regulation of axon fasciculation by Slit-Robo signaling. *Nat Neurosci* 15:367–369. [CrossRef Medline](#)
- Jones CA, Li DY (2007) Common cues regulate neural and vascular patterning. *Curr Opin Genet Dev* 17:332–336. [CrossRef Medline](#)
- Kim AS, Lowenstein DH, Pleasure SJ (2001) Wnt receptors and Wnt inhibitors are expressed in gradients in the developing telencephalon. *Mech Dev* 103:167–172. [CrossRef Medline](#)
- Kobayashi K, Luo M, Zhang Y, Wilkes DC, Ge G, Grieskamp T, Yamada C, Liu TC, Huang G, Basson CT, Kispert A, Greenspan DS, Sato TN (2009) Secreted Frizzled-related protein 2 is a procollagen C proteinase enhancer with a role in fibrosis associated with myocardial infarction. *Nat Cell Biol* 11:46–55. [CrossRef Medline](#)
- Kolkpak A, Zhang J, Bao ZZ (2005) Sonic hedgehog has a dual effect on the growth of retinal ganglion axons depending on its concentration. *J Neurosci* 25:3432–3441. [CrossRef Medline](#)
- Lee HX, Ambrosio AL, Reversade B, De Robertis EM (2006) Embryonic dorsal-ventral signaling: secreted frizzled-related proteins as inhibitors of toll-like proteinases. *Cell* 124:147–159. [CrossRef Medline](#)
- Leimeister C, Bach A, Gessler M (1998) Developmental expression patterns of mouse *sfrp* genes encoding members of the secreted frizzled related protein family. *Mech Dev* 75:29–42. [CrossRef Medline](#)
- Lemmon V, Farr KL, Lagenaur C (1989) L1-mediated axon outgrowth occurs via a homophilic binding mechanism. *Neuron* 2:1597–1603. [CrossRef Medline](#)
- Lin CT, Lin YT, Kuo TF (2007) Investigation of mRNA expression for secreted frizzled-related protein 2 (*sfrp2*) in chick embryos. *J Reprod Dev* 53:801–810. [CrossRef Medline](#)
- Liu H, Mohamed O, Dufort D, Wallace VA (2003a) Characterization of Wnt signaling components and activation of the Wnt canonical pathway in the murine retina. *Dev Dyn* 227:323–334. [CrossRef Medline](#)
- Liu J, Wilson S, Reh T (2003b) BMP receptor 1b is required for axon guidance and cell survival in the developing retina. *Dev Biol* 256:34–48. [CrossRef Medline](#)
- Ludwig A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickert DM, Leesnitzer MA, Becherer JD (2005) Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules. *Combinatorial Chemistry and High-Throughput Screening* 8:161–171. [CrossRef Medline](#)
- Lyckman AW, Moya KL, Confalonni A, Jhaveri S (2000) Early postnatal expression of L1 by retinal fibers in the optic tract and synaptic targets of the Syrian hamster. *J Comp Neurol* 423:40–51. [Medline](#)
- Malinverno M, Carta M, Epis R, Marcello E, Verpelli C, Cattabeni F, Sala C, Mulle C, Di Luca M, Gardoni F (2010) Synaptic localization and activity

- of ADAM10 regulate excitatory synapses through N-cadherin cleavage. *J Neurosci* 30:16343–16355. [Medline](#)
- Marcos S, Backer S, Causeret F, Tessier-Lavigne M, Bloch-Gallego E (2009) Differential roles of Netrin-1 and its receptor DCC in inferior olivary neuron migration. *Mol Cell Neurosci* 41:429–439. [CrossRef Medline](#)
- Marcus RC, Wang LC, Mason CA (1996) Retinal axon divergence in the optic chiasm: midline cells are unaffected by the albino mutation. *Development* 122:859–868. [Medline](#)
- Masai I, Lele Z, Yamaguchi M, Komori A, Nakata A, Nishiwaki Y, Wada H, Tanaka H, Nojima Y, Hammerschmidt M, Wilson SW, Okamoto H (2003) N-cadherin mediates retinal lamination, maintenance of fore-brain compartments and patterning of retinal neurites. *Development* 130:2479–2494. [CrossRef Medline](#)
- McFarlane S (2003) Metalloproteases: carving out a role in axon guidance. *Neuron* 37:559–562. [CrossRef Medline](#)
- Mi ZP, Weng W, Hankin MH, Narayanan V, Lagenaur CF (1998) Maturation changes in cell surface antigen expression in the mouse retina and optic pathway. *Brain Res Dev Brain Res* 106:145–154. [CrossRef Medline](#)
- Mii Y, Taira M (2009) Secreted Frizzled-related proteins enhance the diffusion of Wnt ligands and expand their signalling range. *Development* 136:4083–4088. [CrossRef Medline](#)
- Morcillo J, Martínez-Morales JR, Trousse F, Fermin Y, Sowden JC, Bovolenta P (2006) Proper patterning of the optic fissure requires the sequential activity of BMP7 and SHH. *Development* 133:3179–3190. [CrossRef Medline](#)
- Mühleisen TW, Agoston Z, Schulte D (2006) Retroviral misexpression of cVax disturbs retinal ganglion cell axon fasciculation and intraretinal pathfinding in vivo and guidance of nasal ganglion cell axons in vivo. *Dev Biol* 297:59–73. [CrossRef Medline](#)
- Muraoka O, Shimizu T, Yabe T, Nojima H, Bae YK, Hashimoto H, Hibi M (2006) Sizzled controls dorso-ventral polarity by repressing cleavage of the Chordin protein. *Nat Cell Biol* 8:329–338. [CrossRef Medline](#)
- Nawabi H, Briançon-Marjollet A, Clark C, Sanyas I, Takamatsu H, Okuno T, Kumanogoh A, Bozon M, Takeshima K, Yoshida Y, Moret F, Abouzeid K, Castellani V (2010) A midline switch of receptor processing regulates commissural axon guidance in vertebrates. *Genes Dev* 24:396–410. [CrossRef Medline](#)
- Ohlig S, Farshi P, Pickhinke U, van den Boom J, Höing S, Jakushev S, Hoffmann D, Dreier R, Schöler HR, Dierker T, Borych C, Grobe K (2011) Sonic hedgehog shedding results in functional activation of the solubilized protein. *Dev Cell* 20:764–774. [CrossRef Medline](#)
- Parra LM, Zou Y (2010) Sonic hedgehog induces response of commissural axons to Semaphorin repulsion during midline crossing. *Nat Neurosci* 13:29–35. [CrossRef Medline](#)
- Petros TJ, Rebsam A, Mason CA (2008) Retinal axon growth at the optic chiasm: to cross or not to cross. *Annu Rev Neurosci* 31:295–315. [CrossRef Medline](#)
- Plachez C, Andrews W, Liapi A, Knoell B, Drescher U, Mankoo B, Zhe L, Mambetisaeva E, Annan A, Bannister L, Parnavelas JG, Richards LJ, Sundaresan V (2008) Robos are required for the correct targeting of retinal ganglion cell axons in the visual pathway of the brain. *Mol Cell Neurosci* 37:719–730. [CrossRef Medline](#)
- Plump AS, Erskine L, Sabatier C, Brose K, Epstein CJ, Goodman CS, Mason CA, Tessier-Lavigne M (2002) Slit1 and Slit2 cooperate to prevent premature midline crossing of retinal axons in the mouse visual system. *Neuron* 33:219–232. [CrossRef Medline](#)
- Reiss K, Maretzky T, Ludwig A, Tousseyn T, de Strooper B, Hartmann D, Saftig P (2005) ADAM10 cleavage of N-cadherin and regulation of cell-cell adhesion and beta-catenin nuclear signalling. *EMBO J* 24:742–752. [CrossRef Medline](#)
- Riedel S, Kiefel H, Gast D, Bondong S, Wolterink S, Gutwein P, Altevogt P (2009) Nuclear translocation and signalling of L1-CAM in human carcinoma cells requires ADAM10 and presenilin/gamma-secretase activity. *Biochem J* 420:391–402. [CrossRef Medline](#)
- Riehl R, Johnson K, Bradley R, Grunwald GB, Corneli E, Lilienbaum A, Holt CE (1996) Cadherin function is required for axon outgrowth in retinal ganglion cells in vivo. *Neuron* 17:837–848. [CrossRef Medline](#)
- Rodríguez J, Esteve P, Weinl C, Ruiz JM, Fermin Y, Trousse F, Dwivedy A, Holt C, Bovolenta P (2005) SFRP1 regulates the growth of retinal ganglion cell axons through the Fz2 receptor. *Nat Neurosci* 8:1301–1309. [CrossRef Medline](#)
- Romi E, Gokhman I, Wong E, Antonovsky N, Ludwig A, Sagi I, Saftig P, Tessier-Lavigne M, Yaron A (2014) ADAM metalloproteases promote a developmental switch in responsiveness to the axonal repellent Sema3A. *Nat Commun* 5:4058. [Medline](#)
- Ruiz JM, Rodríguez J, Bovolenta P (2009) Growth and differentiation of the retina and the optic tectum in the medaka fish requires *olSfrp5*. *Dev Neurobiol* 69:617–632. [CrossRef Medline](#)
- Sánchez-Camacho C, Bovolenta P (2008) Autonomous and non-autonomous Shh signalling mediate the in vivo growth and guidance of mouse retinal ganglion cell axons. *Development* 135:3531–3541. [CrossRef Medline](#)
- Sánchez-Camacho C, Bovolenta P (2009) Emerging mechanisms in morphogen-mediated axon guidance. *Bioessays* 31:1013–1025. [CrossRef Medline](#)
- Satoh W, Gotoh T, Tsunematsu Y, Aizawa S, Shimono A (2006) Sfrp1 and Sfrp2 regulate anteroposterior axis elongation and somite segmentation during mouse embryogenesis. *Development* 133:989–999. [CrossRef Medline](#)
- Saxena S, Caroni P (2007) Mechanisms of axon degeneration: from development to disease. *Prog Neurobiol* 83:174–191. [CrossRef Medline](#)
- Sebastián-Serrano A, Sandois A, Cardozo M, Rodríguez-Tornos FM, Bovolenta P, Nieto M (2012) Palphax6 expression in postmitotic neurons mediates the growth of axons in response to SFRP1. *PLoS One* 7:e31590. [CrossRef Medline](#)
- Suh LH, Oster SF, Soehrman SS, Grenningloh G, Sretavan DW (2004) L1/Laminin modulation of growth cone response to EphB triggers growth pauses and regulates the microtubule destabilizing protein SCG10. *J Neurosci* 24:1976–1986. [CrossRef Medline](#)
- Tamada A, Kumada T, Zhu Y, Matsumoto T, Hatanaka Y, Muguruma K, Chen Z, Tanabe Y, Torigoe M, Yamauchi K, Oyama H, Nishida K, Murakami F (2008) Crucial roles of Robo proteins in midline crossing of cerebellofugal axons and lack of their up-regulation after midline crossing. *Neural Dev* 3:29. [Medline](#)
- Terry K, Magan H, Baranski M, Burrus LW (2000) Sfrp-1 and sfrp-2 are expressed in overlapping and distinct domains during chick development. *Mech Dev* 97:177–182. [CrossRef Medline](#)
- Thompson H, Barker D, Camand O, Erskine L (2006a) Slits contribute to the guidance of retinal ganglion cell axons in the mammalian optic tract. *Dev Biol* 296:476–484. [CrossRef Medline](#)
- Thompson H, Camand O, Barker D, Erskine L (2006b) Slit proteins regulate distinct aspects of retinal ganglion cell axon guidance within dorsal and ventral retina. *J Neurosci* 26:8082–8091. [CrossRef Medline](#)
- Thompson H, Andrews W, Parnavelas JG, Erskine L (2009) Robo2 is required for Slit-mediated intraretinal axon guidance. *Dev Biol* 335:418–426. [CrossRef Medline](#)
- Trimarchi JM, Stadler MB, Cepko CL (2008) Individual retinal progenitor cells display extensive heterogeneity of gene expression. *PLoS One* 3:e1588. [CrossRef Medline](#)
- Wang LC, Rachel RA, Marcus RC, Mason CA (1996) Chemosuppression of retinal axon growth by the mouse optic chiasm. *Neuron* 17:849–862. [CrossRef Medline](#)
- Webber CA, Hocking JC, Yong VW, Stange CL, McFarlane S (2002) Metalloproteases and guidance of retinal axons in the developing visual system. *J Neurosci* 22:8091–8100. [Medline](#)
- Weber S, Saftig P (2012) Ectodomain shedding and ADAMs in development. *Development* 139:3693–3709. [CrossRef Medline](#)